



(19)

Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11)

EP 1 031 626 A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
30.08.2000 Patentblatt 2000/35

(51) Int. Cl.⁷: C12N 15/10, C07D 295/037,
C07C 211/63

(21) Anmeldenummer: 00103816.5

(22) Anmeldetag: 23.02.2000

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 23.02.1999 EP 99103457

(71) Anmelder: QIAGEN GmbH
40724 Hilden (DE)

(72) Erfinder:
• Erbacher, Christoph
42781 Haan (DE)

- Bastian, Helge
40597 Düsseldorf-Benrath (DE)
- Wyrich, Ralf
41542 Dormagen (DE)
- Oelmüller, Uwe
40699 Erkrath (DE)
- Manz, Thomas
40237 Düsseldorf (DE)

(74) Vertreter:
Zimmermann, Gerd Heinrich
Zimmermann & Partner,
Sendlingerstrasse 13
80331 München (DE)

(54) Verfahren zur Stabilisierung und/oder Isolierung von Nukleinsäuren

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Stabilisierung und/oder Isolierung von Nukleinsäuren, wobei eine biologische Probe, die Nukleinsäure enthält, mit einer kationischen Verbindung in Kontakt gebracht wird. Die Erfindung betrifft ferner die kationische Verbindung an sich, sowie die Verwendung der kationischen Verbindung zur Stabilisierung und/oder Isolierung von Nukleinsäuren. Die Erfindung betrifft weiterhin pharmazeutische Zusammensetzungen, diagnostische Zusammensetzungen und Zusammensetzungen zur Forschung, die kationische Verbindungen enthalten oder die einen Komplex enthalten, der nach dem Kontakt der kationischen Verbindung mit der Nukleinsäure entsteht.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Stabilisierung und/oder Isolierung von Nukleinsäuren, wobei eine biologische Probe, die Nukleinsäuren enthält, mit einer kationischen Verbindung in Kontakt gebracht wird.

5 Die Erfindung betrifft ferner die kationische Verbindung an sich sowie die Verwendung der kationischen Verbindung zur Stabilisierung und/oder Isolierung von Nukleinsäuren. Die Erfindung betrifft weiterhin pharmazeutische Zusammensetzungen, diagnostische Zusammensetzungen und Zusammensetzungen zur Forschung, die kationische Verbindungen enthalten oder die einen Komplex enthalten, der nach dem Kontakt der kationischen Verbindung mit der Nukleinsäure entsteht.

10 [0002] Es ist seit langem bekannt, daß die genetische Herkunft und funktionelle Aktivität einer Zelle durch Studien ihrer Nukleinsäuren bestimmt und untersucht werden kann. Die Analysen der Nukleinsäuren ermöglichen den direkten Zugriff auf die Ursache der Aktivitäten von Zellen. Sie sind somit indirekten, konventionellen Methoden, wie z.B. dem Nachweis von Stoffwechselprodukten, potentiell überlegen. Daher ist für die Zukunft mit einer starken Verbreitung von Nukleinsäureanalysen zu rechnen. So werden molekularbiologische Analysen bereits in vielen Bereichen eingesetzt, z.B. in der medizinischen und klinischen Diagnostik, in der Pharmazie bei der Entwicklung und Evaluierung von Arzneimitteln, in der Lebensmittelanalytik sowie bei der Überwachung der Lebensmittelherstellung, in der Agrarwirtschaft bei der Züchtung von Nutzpflanzen und Nutztieren sowie in der Umweltanalytik und in vielen Forschungsgebieten.

15 [0003] Durch die Analyse der RNA, speziell der mRNA in Zellen, lassen sich die Aktivitäten von Genen direkt bestimmen. Die quantitative Analyse von Transkriptmustern (mRNA-Mustern) in Zellen durch moderne molekularbiologische Methoden, wie z.B. Echtzeit-Reverse Transkriptase PCR ("Real-Time RT-PCR") oder Genexpressions-Chip-Analysen ermöglicht z.B. die Erkennung fehlerhaft exprimierter Gene, wodurch z.B. Stoffwechselkrankheiten, Infektionen oder die Entstehung von Krebs erkannt werden können. Die Analyse der DNA aus Zellen durch molekularbiologische Methoden, wie z.B. PCR, RFLP, AFLP oder Sequenzierung ermöglicht z.B. den Nachweis genetischer Defekte oder die Bestimmung des HLA-Typs sowie anderer genetischer Marker.

20 [0004] Die Analyse genomicscher DNA und RNA wird auch zum direkten Nachweis von infektiösen Erregern, wie Viren, Bakterien usw. eingesetzt.

25 [0005] Unbedingte Voraussetzung für Nukleinsäureanalytik ist die sofortige Stabilisierung der Nukleinsäuren nach Entnahme der biologischen Probe aus ihrer natürlichen Umgebung. Dies gilt für DNA und RNA, insbesondere für RNA, die nach Entnahme der biologischen Probe sehr schnell abgebaut werden kann. Andererseits kann es nach der Entnahme der biologischen Probe z.B. durch Induktion von Stressgenen auch zur Synthese neuer mRNA-Moleküle kommen, wodurch das Transkriptmuster der Zellen verändert werden kann. Dadurch können nachfolgende Analysen verfälscht werden.

30 [0006] Die Stabilisierung von Nukleinsäuren, insbesondere über längere Zeiträume wie z.B. mehrere Stunden oder Tage bis zu Wochen mit Hilfe von für Routineanalysen geeigneten Mitteln ist bislang kaum möglich. Dies ist sehr nachteilhaft, da z.B. im medizinischen Bereich häufig, etwa in einer Praxis, Nukleinsäure-haltige Proben genommen werden, die erst nach längerer Lagerung und einem Transport in ein Labor weiter untersucht werden können.

35 [0007] In der Zwischenzeit können sich die in den Proben enthaltenen Nukleinsäure verändern oder sogar vollständig zersetzen. Dies beeinflußt natürlich das Ergebnis später durchgeföhrter Tests massiv oder macht diese gänzlich unmöglich. Für solche Tests werden molekularbiologische Techniken wie beispielsweise PCR, Reversed-Transcription-PCR (RT-PCR), SunRise, LCR, branched-DNA (bDNA), SDA, DNA- und RNA-Chips und Arrays zur Genexpressions- und Mutationsanalytik, differential display Analytik, RFLP, AFLP, cDNA-Synthesen, subtraktive Hybridisierung oder die TaqMan-Technologie und ähnliche Echtzeitquantifizierungsverfahren eingesetzt.

40 [0008] Abgesehen von der Stabilisierung betrifft die vorliegende Erfindung auch die Isolierung von Nukleinsäuren.

45 [0009] Dabei soll die Bezeichnung "Nukleinsäure" in ihrem breitesten Sinn verstanden werden, also Ribonukleinsäuren (RNA) wie auch Desoxyribonukleinsäuren (DNA) in allen Längen und Konfigurationen, wie Doppelstrang, Einzelstrang, circulär und linear, verzweigt usw. umfassen und alle möglichen Unterarten, wie z.B. monomere Nukleotide, Oligomere, Plasmide, virale und bakterielle DNA und RNA, sowie genomische und nichtgenomische DNA und RNA aus Tier- und Pflanzenzellen oder anderen Eukaryoten, mRNA in prozessierter und unprozessierter Form, tRNA, hn-RNA, rRNA, cDNA usw.

50 [0010] Stabilisierung und Isolierung sind zwei wichtige Schritte in einer Reaktionskaskade, die eine Analyse auf Nukleinsäurebasis darstellt. Diese Kaskade könnte schematisch wie folgt dargestellt werden:

Probennahme → Stabilisierung → Lagerung → Nukleinsäure-isolierung/Reinigung → Enzymatische Manipulation → Nachweis → Datenanalyse

55 [0011] Die vorliegende Erfindung befaßt sich mit den hervorgehobenen Schritte dieser Kaskade.

[0012] Es gibt eine Reihe von Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren, wobei die Zelle zerstört wird und die

RNA und/oder DNA in Lösung freigesetzt wird. Bekannte Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus komplexen Materialien wie Blut, Serum, Urin oder Faeces umfassen in der Regel die Lyse des biologischen Materials durch ein Detergenz in Gegenwart von Proteinasen, gefolgt von mehreren Extraktionen mit organischen Lösungsmitteln, z.B. Phenol und/oder Chloroform, eine Ethanol-Präzipitation und eine Dialyse der Nukleinsäuren. Solche Verfahren werden z.B. von Chirgwin et al. (Biochem, 18:5294-5299 (1979)), D.M. Wallace in Meth. Enzym., 152:33-41 (1987), (P. Chomczynski und N. Sacchi, Anal. Biochem., 162:156-159 (1987) und "Preparation and Analysis of RNA" in Current Protocols in Molecular Biology, Unit 4.2 (Supplement 14), Herausgeber F.M. Ausubel et al., John Wiley (1991)). (T. Maniatis et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory (1992)); (L.G. Davis et al. "Guanidine Isothiocyanate Preparation of Total RNA" und "RNA Preparation: Mini Method" in Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier, N.Y. Seiten 130-138 (1991)) und in dem US Patent Nr. 4,843,155 für Chomczynski beschrieben.

[0013] Es ist ferner bekannt Nukleinsäuren aus verschiedenen Ausgangsmaterialien zu isolieren, indem das Ausgangsmaterial mit einer chaotropen Substanz und einer die Nukleinsäure bindenden, festen Phase gemischt wird. In einem weiteren Schritt wird die feste Phase von der Flüssigkeit getrennt und gewaschen. Falls nötig, können die Nukleinsäuren von der festen Phase eluiert werden (US 5,234,809).

[0014] Diese bekannten Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen Materialien sind oft sehr arbeits- und zeitaufwendig. Die meist relativ große Anzahl von Schritten, die notwendig ist um die Nukleinsäuren aus solchen Ausgangsmaterialien zu reinigen, vergrößern das Risiko einer Übertragung der Nukleinsäuren von Probe zur Probe, wenn gleichzeitig verschiedene klinische Proben verarbeitet werden. Wenn die Nukleinsäure für den nachfolgenden Nachweis der Gegenwart von Nukleinsäuren von z.B. einem pathogenen Organismus durch ein Nukleinsäure-

Amplifikationsverfahren isoliert wird, z.B. für die sehr sensitive Polymerase-Kettenreaktion, führt das Risiko einer solchen Übertragung von Nukleinsäuren zwischen verschiedenen Proben zu falschpositiven Resultaten, was natürlich einen ernsten Nachteil darstellt.

[0015] In MacFarlane US 5,010,183 und MacFarlane US 5,300,635 werden ausführlich Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren unter Verwendung kationischer Detergenzen auf der Basis quartärer Ammoniumverbindungen beschrieben. Die in den oben genannten Patenten geschützten Ammoniumverbindungen haben alle die allgemeine Form $[N(R)_4]^+ X^-$, wobei R für verschiedene Alkyl- oder Arylgruppen mit einer unterschiedlichen Anzahl der C-Atome steht und X für ein Gegenion aus einer Gruppe von Carbonsäuren, Sulfat, Phosphat oder einem Halogenid. Außerdem sind hohe g-Zahlen zur Pelletierung der Komplexe aus Nukleinsäure und Detergenz notwendig. Die Isolierung von Nukleinsäuren mit den oben beschriebenen Verfahren ist zwar im Prinzip möglich, jedoch sind hohe Carrier-Mengen und hohe g-Zahlen notwendig.

[0016] Die in den oben genannten Patenten beschriebenen Beispiele beziehen sich alle auf die Extraktion von Nukleinsäuren aus Vollblut oder Zellen (menschliche und E.coli). In diesen Probenmaterialien ist eine gewisse Mindestmenge an Nukleinsäuren vorhanden. Z.T. wurde zusätzlich noch tRNA als Carrier zugegeben. Am Beispiel der Aufreinigung von kleinen Mengen (z.B. in niedrigen Kopienzahlen bei viralen Infektionen) von RNA aus zellfreien Probenmaterialien wie Plasma konnte am Beispiel des Tetradecyltrimethylammonium-Oxalats gezeigt werden, daß eine Komplexierung/Pelletierung nur unter Einsatz großer Mengen Carrier RNA (100 µg/ml Plasma) möglich ist. Die Notwendigkeit einer solchen Aufreinigung stellt sich z.B. beim Nachweis viraler RNA in Plasma- oder Serumproben. Die hohen Carriermengen stellen bei einem nachfolgenden Nachweis der viralen RNA mittels RT-PCR ein Problem dar, da die reverse Transkription durch hohe Carrierkonzentrationen inhibiert wird. MacFarlane beschreibt selber auch eine niedrigere Sensitivität des Nachweises von HCV in Plasma (ohne Carrier), verglichen mit Blut (Schmidt et al. J.Med.Viro. 47: 153-160 (1995)). Ohne hohe Nukleinsäuremengen ist die Sensitivität sehr schlecht. Des Weiteren beschreibt MacFarlane in US 5,300,635 die Sedimentation der RNA-Detergenz-Komplexe durch Zentrifugation bei hohen g-Zahlen (16000 x g in den Beispielen 4, 5 und 6). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, daß eine Zentrifugation bei niedrigeren g-Zahlen nicht ausreicht, um RNA-Tetradecyltrimethylammonium Oxalat-Komplexe aus Plasma zu sedimentieren. Zur Aufreinigung viraler RNA aus großen Volumina Plasma oder Serum (> 1ml) ist es zwingend notwendig, die Sedimentation der Nukleinsäure-Detergenz-Komplexe bei niedrigen g-Zahlen zu erreichen, da ansonsten teure und aufwendige Ultrazentrifugen anstelle einfacher Laborzentrifugen (mit einer maximal erreichbaren g-Zahl von 5000-6000) verwendet werden müßten.

[0017] In den Anwendungsbeispielen in US 5,300,635 beschreibt MacFarlane die Zugabe von mindestens 2 Volumen bis hin zu 10 Volumen Detergenz zur Probe. Damit erhöht sich das zu verarbeitende Gesamtvolume z.T. beträchtlich, insbesondere wenn man an die Aufreinigung von Nukleinsäuren aus mehreren Millilitern Probenmaterial (z.B. Plasmapools) denkt. Die Verarbeitung großer Volumina ist aber vor allem im Hinblick auf eine mögliche Automatisierung der Probenvorbereitung auf einem Pipettierroboter ungünstig, da z.B. die Pipettervolumina begrenzt sind.

[0018] Es bestand daher ein Bedarf an einem Verfahren zur Stabilisierung und/oder Isolierung von Nukleinsäuren, das die oben genannten Nachteil des Stands der Technik nicht aufweist.

[0019] Insbesondere bestand ein Bedarf an einem Verfahren, bei dem die Nukleinsäuren in einem einzigen Schritt stabilisiert und/oder die die Nukleinsäuren enthaltende Probe lysiert und die Nukleinsäuren aus der gleichen Lösung isoliert werden können. Dies wird z.B. wichtig, wenn Nukleinsäuren aus solchen Proben stabilisiert/isoliert werden sol-

EP 1 031 626 A1

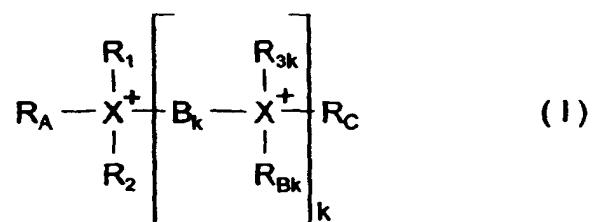
len, bei denen es nach Einnahme der Probe zur Induktion von Streßgenen und damit zur Synthese neuer m-RNA-Moleküle kommen kann, wodurch das Transkriptmuster der Zellen verändert werden könnte. Insbesondere bestand weiterhin ein Bedarf an einem Verfahren, bei dem die Komplexe bestehend aus Nukleinsäure und kationischen Verbindungen bei niedrigen g-Zahlen sedimentiert werden können. Ferner bestand insbesondere ein Bedarf an einem Verfahren, bei dem nur geringe oder gar keine Mengen Carrier-Nukleinsäuren oder Carrier-Hilfen, z.B. Heparin, notwendig sind. Es bestand außerdem ein Bedarf an einem Verfahren, bei dem geringere Volumina der kationischen Verbindung der Probe zugegeben werden können. Schließlich bestand ein Bedarf an einem Verfahren, das es ermöglicht, bereits nach dem ersten Verfahrensschritt in kleinen Volumina arbeiten zu können.

5 [0020] Diese Aufgaben werden durch das in Anspruch 1 beschriebene Verfahren und die weiteren unabhängigen Ansprüche gelöst. Bevorzugte Ausführungsformen sind in den Unteransprüchen angegeben.

10 [0021] Es soll ein Verfahren zur Stabilisierung und/oder Isolierung von Nukleinsäuren aus einer biologischen Probe geschaffen werden. Diese Aufgabe wird erfahrungsgemäß durch das Verfahren zur Stabilisierung und/oder Isolierung von Nukleinsäuren aus einer biologischen Probe gemäß unabhängigen Patentanspruch 1, dem Kit zur Stabilisierung und/oder Isolierung von Nukleinsäuren gemäß unabhängigen Patentanspruch 27, den Komplex gemäß unabhängigen Patentanspruch 32, die pharmazeutische Zusammensetzung gemäß unabhängigen Patentanspruch 34, die Zusammensetzung für die Forschung gemäß unabhängigen Patentanspruch 35, sowie die kationische Verbindung gemäß unabhängigen Patentanspruch 36 gelöst.

15 [0022] Erfahrungsgemäß wird zur Stabilisierung und/oder Isolierung von Nukleinsäuren eine biologische Probe mit mindestens einer kationischen Verbindung der Formel (I) in Kontakt gebracht.

20



30

[0023] Unter dem Begriff "kationische Verbindung" wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Verbindung mit mehr als einer positiven Ladung verstanden. Die als Formel (I) wiedergegebene kationische Verbindung wird in gelöster Form und/oder in Form eines Salzes eingesetzt, wobei die Neutralisierung der Ladung durch konjugierte Basen von starken und/oder schwachen anorganischen und/oder organischen Säuren erfolgt, die im folgenden mit "A" abgekürzt werden. Dies bedeutet, daß das Produkt aus Ladung und Anzahl an Basen A genau die positiven Ladungen der restlichen Verbindung kompensiert.

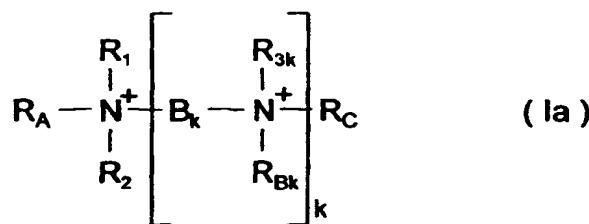
[0024] In der oben genannten Formel (I) steht X für Stickstoffatome (N) oder Phosphoratome (P). In Formel (Ia) ist 40 die kationische Verbindung mit X = N gezeigt, und in Formel (Ib) mit X = P.

45

50

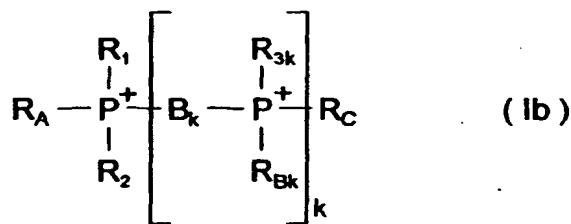
55

5



10

15



20

- 25 [0025] Daneben bedeutet in allen drei vorgenannten Formeln (l), (la) und (lb) k die ganze Zahl 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 oder 24, während B_k für aliphatische Alkandiylbrücken steht, in denen ein oder mehrere nicht benachbarte Kohlenstoff-Atome durch Sauerstoff ersetzt sein können und die die Struktur

30 $-(CH_2)_n-(OCH_2)_m-$

aufweisen. Die Alkandiyl-Brücken können im Rahmen der vorliegenden Erfindung an einem oder an mehreren Kohlenstoff-Atomen substituiert sein. Die Parameter n und m sind unabhängig voneinander und bedeuten eine der ganzen Zahl 0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6, wobei $n + m > 0$ ist.

- 35 [0026] Alternativ zu den oben angegeben Strukturen bedeutet B_k auch eine substituierte Phenyl-, Naphthyl- oder Biphenyl-Brücke der Struktur

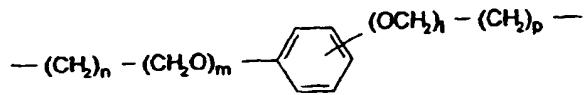
40

45

50

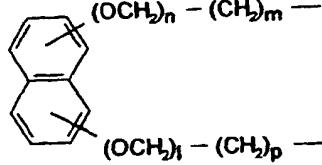
55

5



oder

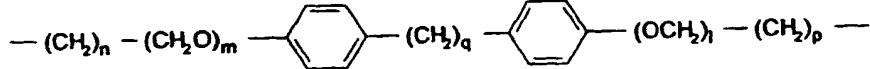
10



15

oder

20

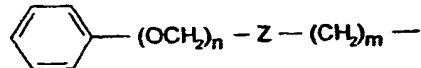


25 wobei n, m, l, p, q unabhängig voneinander sind und eine der ganzen Zahlen 0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6 bedeuten. Die Phenyl-, Naphthyl- oder Biphenyl-Brücke kann zusätzlich an einem oder an mehreren Kohlenstoff-Atomen substituiert sein.

[0027] In der oben angegebenen Formel (I) bedeutet daneben

30 R₁, R₂, R_{3k}, die identisch oder unterschiedlich voneinander sein können und die unsubstituiert oder an einem oder mehreren Kohlenstoff-Atomen substituiert sein können, Wasserstoff, ein lineares oder verzweigtes C₁-C₆-Alkyl, ein lineares oder verzweigtes C₁-C₆-Alkenyl, ein lineares oder verzweigtes C₁-C₆-Alkinyl, ein Phenyl, ein Benzyl, ein Phenoxyethyl der Struktur

35



wobei n, m unabhängig voneinander die ganze Zahl 0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6 bedeutet und Z eine der Strukturen -O-, -CO-, -CO₂-, -OCO-, -CO-N-, -N-CO-, -O-CO-N-, -N-CO-O-, -S- oder -S-S-bezeichnet.

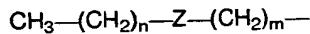
40 [0028] Außerdem kann R₁, R₂, R_{3k} ein Phenyl, ein Benzyl, ein Phenoxyethyl der Struktur



45

bezeichnen, wobei n, m unabhängig voneinander die ganze Zahl 0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6 bedeutet.

50 [0029] R_A, R_{Bk}, R_C, die identisch oder unterschiedlich voneinander sein können und die unsubstituiert oder an einem oder mehreren Kohlenstoff-Atomen substituiert sein können, bedeuten Wasserstoff, ein lineares oder verzweigtes C₁-C₂₁-Alkyl, ein lineares oder verzweigtes C₁-C₂₁-Alkenyl, ein lineares oder verzweigtes C₁-C₂₁-Alkinyl, oder eine Struktur



55

wobei n, m unabhängig voneinander die ganze Zahl 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 oder 24 bedeutet und Z eine der Strukturen -O-, -CO-, -CO₂-, -OCO-, -CO-N-, -N-CO-, -O-CO-N-, -N-CO-O-, -S- oder -S-S- bezeichnet.

[0030] Alternativ bilden R_A und R_C zusammen einen Rest R_{AC} und somit eine cyclische Struktur

5

10

15

20

25

30

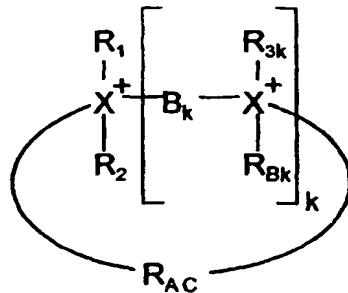
35

40

45

50

55



wobei der Rest R_{AC} , der unsubstituiert oder an einem oder mehreren Kohlenstoff-Atomen substituiert sein kann, ein lineares oder verzweigtes C₁-C₈-Alkyl, ein lineares oder verzweigtes C₁-C₈-Alkenyl, oder ein lineares oder verzweigtes C₁-C₈-Alkinyl bedeutet.

[0031] Für den Fall, daß $k > 1$ ist, können die Brückengruppen B_k sowie die Gruppen R_{Bk} und R_{3k} gleich oder verschieden voneinander sein.

[0032] Die oben angegebenen Verbindungen werden in dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendet, wodurch Nukleinsäuren in einem einzigen Schritt stabilisiert, die die Nukleinsäuren enthaltende Probe lysiert und/oder die Nukleinsäuren isoliert werden können. Die stabilisierten Nukleinsäuren sind nicht nur während der Präparation sondern auch über einen längeren Zeitraum, wie z.B. 96 h oder mehr, stabil. Insbesondere können die Komplexe bestehend aus Nukleinsäure und kationischer Verbindung bei niedrigen g-Zahlen sedimentiert werden, wobei nur geringe oder gar keine Mengen Carrier-Nukleinsäuren oder Carrier-Hilfen notwendig sind. Dabei müssen nur geringe Volumina oder Mengen der kationischen Verbindung der Probe zugegeben werden. Ferner kann durch die Pelletierung der Komplexe bereits nach diesem Schritt in kleinen Volumina gearbeitet werden.

[0033] Durch die erfindungsgemäße Stabilisierung von Nukleinsäuren wird erreicht, daß die Nukleinsäuren in einer Probe auch bei längerer Lagerung oder während eines Transports ihre Struktur nicht verändern und die Genauigkeit später durchgeführter Tests wird deutlich erhöht. In manchen Fällen, z.B. wenn Nukleinsäure-haltiges Material über weite Strecken transportiert oder länger gelagert werden muß, macht das erfindungsgemäße Verfahren diese Tests überhaupt erst möglich.

[0034] Die Verbindung kann in Lösung oder auch als Feststoff zugesetzt werden. Die Möglichkeit einer Zugabe als Feststoff beinhaltet die weiteren Vorteile, daß Feststoffe meist chemisch stabiler sind und ihre Zugabe zur Probe oft einfacher durchführbar ist. Es kann eine kationische Verbindung oder eine Mischung aus zwei oder mehr kationischen Verbindungen zugefügt werden.

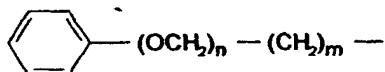
[0035] In dem erfindungsgemäßen Verfahren werden bevorzugt Verbindungen der oben angegebenen allgemeinen Formel (I) verwendet, wobei ein Anion A ausgewählt aus der Gruppe: Fluorid, Chlorid, Bromid, Jodid, Perchlorat, Perbromat, Periodat, Phosphat, Hydrogenphosphat, Dihydrogenphosphat, Sulfat, Thiosulfat, Hydroxid, Carbonsäuren, α-Halogen-Carbonsäuren und/oder Hydroxy-Carbonsäuren verwendet wird, und k für die ganze Zahl 1, 2, 3, 4, 5 oder 6 steht, während für den Fall, daß B_k eine substituierte Phenyl-, Naphthyl- oder Biphenyl-Brücke bezeichnet, n, m, l, p, q unabhängig voneinander die ganze Zahl 0, 1 oder 2 bedeutet.

[0036] In den erfindungsgemäß bevorzugten Verbindungen der allgemeinen Formel (I) bedeuten die Reste R_1 , R_2 und R_{3k} , die identisch oder unterschiedlich voneinander sein können, die C₁-C₆-Alkyl-Gruppen methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, 1-methylpropyl, 2-methylpropyl, 1,1-dimethylethyl, n-pentyl, 1-methylbutyl, 2-methylbutyl, 3-methylbutyl, 1,1-dimethylpropyl, 1,2-dimethylpropyl, 2,2-dimethylpropyl, 1-ethylpropyl, hexyl, 1-methylpentyl, 2-methylpentyl, 3-methylpentyl, 4-methylpentyl, 1,1-dimethylbutyl, 1,2-dimethylbutyl, 1,3-dimethylbutyl, 2,2-dimethylbutyl, 2,3-dimethylbutyl, 3,3-dimethylbutyl, 1-ethylbutyl, 2-ethylbutyl, 1,1,2-trimethylpropyl, 1,2,2-trimethylpropyl, 1-ethyl-1-methylpropyl und/oder 1-ethyl-2-methyl-propyl, und/oder die C₃-C₆-Alkenyl-Gruppen 2-propenyl (allyl), 2-butenyl, 3-butenyl, 1-methyl-2-propenyl, 2-methyl-2-propenyl, 2-pentyl, 3-pentyl, 4-pentyl, 1-methyl-2-butenyl, 2-methyl-3-butenyl, 3-methyl-3-butene, 1,1-dimethyl-2-propenyl, 1,2-dimethyl-2-propenyl, 1-ethyl-2-propenyl, 2-hexenyl, 3-hexenyl, 4-hexenyl, 5-hexenyl, methyl-2-pentenyl, 2-methyl-2-pentenyl, 3-methyl-2-pentenyl, 4-methyl-2-pentenyl, 1-methyl-3-pentenyl, 2-methyl-3-pentenyl, 3-methyl-3-pentenyl, 4-methyl-3-pentenyl, 1-methyl-4-pentenyl, 3-methyl-4-pentenyl, 4-methyl-4-pentenyl, 1,1-dimethyl-2-butene, 1,1-dimethyl-2-butene, 1,1-dimethyl-3-butene, 1,2-dimethyl-2-butene, 1,2-dimethyl-3-butene, 1,3-dimethyl-2-butene, 1,3-dimethyl-3-butene, 2,2-dimethyl-3-butene, 2,3-dimethyl-2-ethyl-2-butene, 2-ethyl-3-butene, 1,1,2-trimethyl-2-propenyl, 1-ethyl-1-methyl-2-propenyl und/oder 1-ethyl-2-methyl-2-propenyl, und/oder die C₃-C₆-Alkinyl-Gruppen 2-propinyl (propargyl), 2-butinyl, 3-butinyl, 2-pentinyl, 3-pentinyl, 4-pentinyl, 3-

EP 1 031 626 A1

5 methyl-2-butinyl, 2-hexinyl, 3-hexinyl, 4-hexinyl, 5-hexinyl, 3-methyl-2-pentinyl, 4-methyl-2-pentinyl, 2-methyl-3-pentinyl,
 4-methyl-3-pentinyl, 1-methyl-4-pentinyl, 1,1-dimethyl-2-butinyl, 1,1-dimethyl-2-butinyl, 1,1-dimethyl-3-butinyl, 1,2-dimethyl-3-butinyl, 1,3-dimethyl-2-butinyl, 2,2-dimethyl-3-butinyl, 1-ethyl-2-butinyl, 1-ethyl-3-butinyl, 2-ethyl-3-butinyl und/oder 1-ethyl-1-methyl-2-propinyl und/oder die Gruppen Benzyl, Phenylethyl, Phenylpropyl, Phenylisopropyl Phenylisobutyl, Phenoxyethyl, Phenoxypropyl, Phenoxyisopropyl, Phenoxybutyl, Phenoxyisobutyl der Struktur

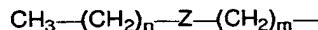
10



wobei n, m unabhängig voneinander die ganze Zahl 0, 1 oder 2 bedeutet.

15 [0037] Die Reste R_A , R_{Bk} , R_C , die identisch oder unterschiedlich voneinander sein können, bedeuten die linearen oder verzweigten C_8-C_{20} -Alkyl-Gruppen octyl, decyl, undecyl, dodecyl, tridecyl, tetradecyl, pentadecyl, hexadecyl, heptadecyl, octadecyl, nonadecyl und/oder eicosyl und/oder die linearen oder verzweigten C_8-C_{20} -Alkenyl-Gruppen octenyl, decenyl, undecenyl, dodecenyl, tridecenyl, tetradecenyl, pentadecenyl, hexadecenyl, heptadecenyl, octadecenyl, nonadecenyl und/oder eicosenyl und/oder die linearen oder verzweigten C_8-C_{20} -Alkinyl-Gruppen octinyl, decinyl, undecinyl, dodecinyl, tridecinyl, tetradecinyl, pentadecinyl, hexadecinyl, heptadecinyl, octadecinyl, nonadecinyl und/oder eicosinyl und/oder eine Struktur

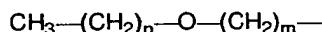
20



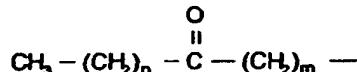
25 wobei n, m unabhängig voneinander sind und n die ganze Zahl 2, 3 oder 4 bedeutet und m die ganze Zahl 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 oder 18 bedeutet und Z eine der Strukturen -O-, -CO-, -OCO-, -CO-N- oder -N-CO- bezeichnet.

[0038] Bevorzugt werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung Verbindungen der allgemeinen Formel (I) verwendet, wobei eine oder mehrere der als R_A , R_{Bk} und R_C bezeichneten Gruppen eine der Strukturen

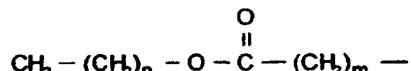
30



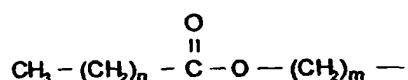
35



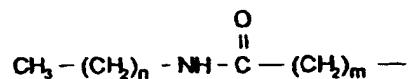
40



45

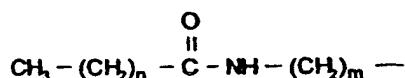


50



oder

55



bedeuten.

[0039] Unter den oben genannten, erfindungsgemäß bevorzugten Verbindungen werden die Verbindungen ganz besonders bevorzugt, die in einem oder mehreren der Reste R₁, R₂, R_{3k}, R_A, R_{Bk} und R_C eine Doppelbindung oder eine Dreifachbindung aufweisen.

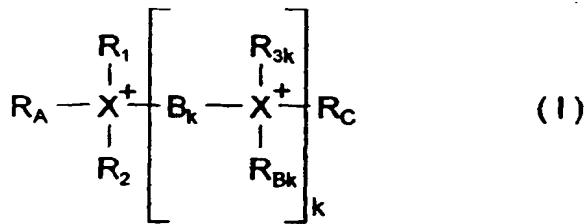
5 [0040] Insbesondere werden die Verbindungen bevorzugt, in denen als Reste R₁, R₂ und/oder R_{3k} die Allyl-Gruppe verwendet wird.

[0041] Insbesondere bevorzugt werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung Verbindungen der oben angegebenen allgemeinen Formel (I) verwendet, wobei ein Anion A ausgewählt aus der Gruppe: Bromid, Jodid, Perchlorat, Hydrogenphosphat, Sulfat, Acetat, Trifluoracetat, Trichloracetat, Benzoat, Oxalat, Succinat, Phthalat, Citrat, Tartrat, Maleat, Malonat, Fumarat verwendet wird. Weiterhin bedeutet k die ganze Zahl 1 oder 2, während B_k die aliphatischen C₂-C₄-Alkandiylenbrücken Ethan-1,1-diyyl, Ethan-1,2-diyyl, Propan-1,1-diyyl, Propan-1,2-diyyl, Propan-1,3-diyyl, Butan-1,1-diyyl, Butan-1,2-diyyl, Butan-1,3-diyyl und/oder Butan-1,4-diyyl bezeichnet. R₁, R₂, R_{3k} bedeuten methyl, ethyl oder hydroxyethyl, während R_A, R_{Bk}, R_C die linearen C₈-C₂₀-Alkyl-Gruppen octyl, decyl, undecyl, dodecyl, tridecyl, tetradecyl, pentadecyl, hexadecyl, heptadecyl, octadecyl, nonadecyl und/oder eicosyl bedeuten.

10 [0042] Ganz besonders bevorzugt werden in dem erfindungsgemäßen Verfahren Verbindungen der allgemeinen Formel (I) verwendet, wobei die Reste R₁, R₂ und R_{3k} identisch sind und/oder R_A, R_{Bk} und R_C identisch sind und/oder für den Fall, daß k > 1 ist, die Brückengruppen B_k identisch sind.

15 [0043] In sämtlichen erfindungsgemäß verwendeten Verbindungen können die Kohlenstoff-Atome der Gruppen R₁, R₂, R_{3k}, R_A, R_{Bk} und R_C mit einem oder mehreren Halogenatomen, insbesondere einem oder mehreren Fluor-Atomen, und/oder einer oder mehreren primären, sekundären und/oder tertiären Hydroxylgruppen und/oder einer oder mehreren -SH, -NH₂, -NH- und/oder =N-Gruppen substituiert sein, wobei die Substituenten untereinander identisch oder nicht identisch sein können. Dabei werden die Verbindungen bevorzugt, bei denen der Abstand zwischen dem ersten substituierten Kohlenstoff-Atom und dem in der allgemeinen Formel (I) gezeichneten Stickstoff mindestens zwei kovalente Bindungen beträgt. Dies bedeutet also, daß ein oder mehrere der Kohlenstoff-Atome der Gruppen R₁, R₂, R_{3k}, R_A, R_{Bk} und R_C, die nicht direkt an eines der Atome X (Stickstoff oder Phosphor) der Verbindung

25



35

gebunden sind, substituiert sind.

[0044] Ebenso können in sämtlichen Ausführungsformen die aliphatischen und/oder aromatischen Kohlenstoff-Atome der Brückengruppen B_k mit einem oder mehreren Halogenatomen, insbesondere Fluor-Atomen, und/oder einer oder mehreren primären, sekundären und/oder tertiären Hydroxylgruppen und/oder einer oder mehreren -SH, -NH₂, -NH- und/oder =N-Gruppen und/oder einer oder mehreren linearen oder verzweigten C₁-C₄-Alkylgruppen substituiert sein, wobei die Substituenten untereinander identisch oder nicht identisch sein können. Als Substituenten der Kohlenstoff-Atome der Brückengruppen B_k werden insbesondere Methyl-, Ethyl-, Propyl-, i-Propyl-, Butyl-, 2-Methylpropyl- und tert.-Butyl-Gruppen bevorzugt.

40 [0045] Ganz besonders bevorzugt wird das erfindungsgemäße Verfahren mit den kationischen Verbindungen Ethandiyyl-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), Propandiyyl-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), Ethandiyyl-1,2-bis(dimethyltetradecylammoniumbromid) oder N, N', N"-Tridecyl-N,N,N',N"-pentamethyl-bis-(2-ammonioethyl)ammoniumbromid durchgeführt.

45 [0046] Wie bereits angesprochen, kann die mindestens eine kationische Verbindung sowohl als Feststoff, als auch in gelöster Form zu der Probe gegeben werden. Wird die kationische Verbindung in Lösung zugegeben, so werden in dem erfindungsgemäßen Verfahren 0,001 bis 10 Volumen, besonders bevorzugt 0,01-10 Volumen, noch bevorzugter 0,05 bis 2 Volumen und insbesondere bevorzugt 1 Volumen der Lösung der Probe zugegeben, also deutlich geringere Mengen als aus dem Stand der Technik bekannt. Größere oder kleinere Volumina sind auch möglich, falls dies praktische Vorteile bietet. Die Lösung der kationischen Verbindung weist dabei eine Konzentration von 0,01% bis Sättigung, bevorzugt 0,5 bis 5%, besonders bevorzugt 2 bis 4% auf.

50 [0047] Vor dem Inkontaktbringen kann die biologische Probe selbstverständlich vorgereinigt werden, falls dies für die weitere Verarbeitung von Vorteil ist.

55 [0048] Nach dem in Kontakt bringen der kationischen Verbindung mit einer biologischen Probe kann die kationischen Verbindung mit der biologischen Probe vermischt und die Mischung inkubiert werden, wobei bevorzugt 10 Minu-

ten bei Raumtemperatur inkubiert wird.

[0049] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung können der kationischen Verbindung und/oder dem gebildeten Komplex aus Nukleinsäure und kationischer Verbindung weitere Mittel zur Unterstützung der Lyse zugefügt werden. Als Mittel zur Unterstützung der Lyse können Alkohole, insbesondere verzweigte oder unverzweigte C1- bis C4-Alkanole wie Isopropanol, Aldehyde, insbesondere niedere C1- bis C4-Aldehyde, verzweigt oder unverzweigt, wie z.B. Glyoxal, Phenole, Phenolderivate, wie z.B. 2-Biphenyol, ionische, zwitterionische und nicht-ionische Verbindungen, Sulfhydryl reduzierende Reagenzien, insbesondere Dithiothreitol, Phosphorsäurederivate, insbesondere Tributylphosphat, chaotrope Reagenzien, wie Harnstoff, Carbonsäuren, wie z.B. Zitronensäure oder Malonsäure, oder einfache Salze, wie Ammoniumsalze oder Alkaliphosphate, einzeln oder in Kombination verwendet werden.

[0050] Ferner ist es gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung auch denkbar, die biologische Probe zu homogenisieren oder mechanisch oder enzymatisch auf sie einzuwirken, bevor oder während die kationische Verbindung zugegeben wurde/wird. Eine mechanische Einwirkung könnte zum Beispiel mit einem elektrischen Messer, einer Kugelmühle, durch Zugabe von Partikeln oder durch Pressen durch eine Spritze geschehen, während geeignete Enzyme zur Einwirkung auf die Probe beispielsweise Hydrolasen, Proteasen oder Lipasen sein könnten. Weitere Möglichkeiten sind dem Fachmann bekannt und sollen hier umfaßt sein. Eine solche Behandlung der biologischen Probe könnte darin vorteilhaft sein, daß die kationische Verbindung besser mit ihren Angriffspunkten in Kontakt treten kann.

[0051] Erfindungsgemäß werden die gebildeten Komplexe aus Nukleinsäure und kationischer Verbindung durch Zentrifugation sedimentiert. Die Zentrifugation wird bevorzugt bei niedrigen g-Zahlen, insbesondere 500 bis 5000 x g, für 3 bis 10 Minuten durchgeführt. Durch die Sedimentierung der Komplexe in ein kleines Pellet kann die weitere Aufreinigung der Nukleinsäuren in relativ kleinen Volumina durchgeführt werden. Dies ist besonders für Routineanwendungen von Vorteil, im besonderen bei automatisierten Verfahren. Durch die Zentrifugation bei niedrigen g-Zahlen können einfache Laborzentrifugen Verwendung finden.

[0052] Die Komplexe können anschließend gegebenenfalls mit einem geeigneten Puffer oder mit Wasser gewaschen werden, wobei Verunreinigungen entfernt werden könnten. Die Komplexe, bestehend aus kationischer Verbindung und Nukleinsäuren, werden anschließend in einem relativ kleinen Volumen eines geeigneten Puffers wieder aufgelöst, wodurch die Nukleinsäuren in dem Puffer freigesetzt werden. Danach können die Nukleinsäuren bei Bedarf auf verschiedene, bekannte Verfahren in relativ kleinen Volumina weiter aufgereinigt werden. So können sie z.B. nach Einstellung entsprechender Bindebedingungen an eine Membran zur weiteren Aufreinigung gebunden werden. Alternativ zur Abtrennung durch Zentrifugation können die Komplexe aus Nukleinsäure und kationischer Verbindung durch Vakuum, Überdruck, Zentrifugation oder Kapillarkräfte auf einer Oberfläche, z.B. der Oberfläche einer Membran oder auf dem Boden eines Gefäßes konzentriert werden. Gegebenenfalls können die Komplexe hiernach in einer geeigneten Waschlösung gewaschen werden, wodurch vorteilhaft verbleibende Verunreinigungen entfernt werden könnten. Die Komplexe können anschließend durch Zugabe einer geeigneten Reagenzienlösung, gegebenenfalls einschließlich eines Enzyms und/oder mechanischer Einwirkung, unter nicht bindenden oder bindenden Bedingungen aufgelöst werden, wobei die Nukleinsäuren in die Lösung freigesetzt werden. Werden sie unter bindenden Bedingungen aufgelöst, können die Nukleinsäuren z.B. auf derselben Membran wie oben mittels Zentrifugation, Vakuum, Überdruck oder Kapillarkräften gebunden werden, wobei derartige Verfahren z.B. in der PCT-Anmeldung Nr. 40 PCT/EP98/06756 beschrieben sind und hier durch Inbezugnahme inkorporiert sein sollen, und weiter aufgereinigt werden. Werden die Komplexe unter nicht bindenden Bedingungen gelöst, können die freigesetzten Nukleinsäuren mittels Zentrifugation, Vakuum oder Überdruck in einem Sammelrörchen aufgefangen werden. Sie können anschließend bei Bedarf mit verschiedenen, bekannten Verfahren in relativ kleinen Volumina weiter aufgereinigt werden. So können sie z.B. selbstverständlich nach Einstellung entsprechender Bindebedingungen ebenfalls wieder an eine Membran oder andere Oberfläche zur weiteren Aufreinigung gebunden werden.

[0053] Als biologische Probe mit Nukleinsäuren können zellfreies Probenmaterial, Lebensmittelproben, die freie oder gebundene Nukleinsäuren oder Nukleinsäurehaltige Zellen enthalten, Umweltpolen, die freie oder gebundene Nukleinsäuren oder Nukleinsäurehaltige Zellen enthalten, eine Suspension von Zellen, Bakterien, Viren oder Hefen, ein Gewebe jeder Art oder eine klinische Probe, wie Blut, Plasma, Serum, Leukozytenfraktionen, Crusta Phlogistica, Sputum, Urin, Sperma, Faeces oder Abstriche, sowie eine Pflanze oder ein Pflanzenteil oder freie Nukleinsäuren verwendet werden, sowie jede weitere denkbare Probe, die Nukleinsäuren enthält.

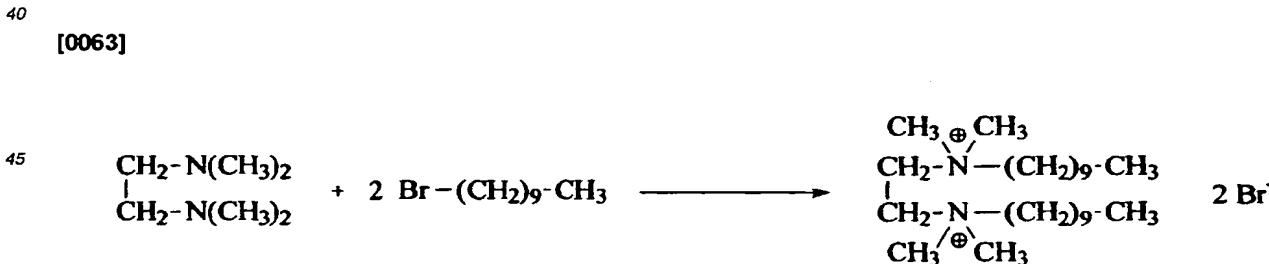
[0054] Erfindungsgemäß werden die oben spezifizierten kationischen Verbindungen in einem Kit zur Stabilisierung und/oder Isolierung von Nukleinsäuren verwendet, das bevorzugt zusätzlich geeignete Puffer enthält. Das Kit kann daneben auch geeignete Mittel zur Unterstützung der Lyse und/oder Mittel zur Aufreinigung der Nukleinsäuren und/oder Mittel zur mechanischen Einwirkung und/oder Mittel zur enzymatischen Behandlung der Probe und/oder der Komplexe enthalten.

[0055] Erfindungsgemäß werden die oben spezifizierten kationischen Verbindungen zur Stabilisierung und/oder Isolierung von Nukleinsäuren verwendet. Dabei entsteht ein Komplex, der aus einer Nukleinsäure und einer kationi-

schen Verbindung besteht. Dieser Komplex zeichnet sich durch seine besonders vorteilhafte, hohe Stabilität aus, wodurch Nukleinsäuren vor einem Abbau aus der Probe selbst heraus oder durch Einwirkungen aus der Umgebung geschützt werden.

- [0056] Erfundungsgemäß finden die oben spezifizierten kationischen Verbindungen oder Komplexe Verwendung in pharmazeutischen Zusammensetzungen, diagnostischen Zusammensetzungen, wobei diese diagnostischen Zusammensetzungen sowohl die Diagnostik im medizinisch-pharmazeutischen Bereich umfassen sollen als auch die Untersuchung von Lebensmittel- und Umweltproben, sowie Zusammensetzungen für die Forschung. Zum Beispiel könnte der entstandene stabilisierte Komplex aus Nukleinsäure und kationischer Verbindung vorteilhaft für die Einschleusung von pharmazeutisch wirksamer NS in erkrankte Zellen genutzt werden.
- [0057] Unter die im Rahmen der vorliegenden Erfundung beanspruchten Gegenstände fallen auch sämtliche oben spezifizierten kationischen Verbindungen.
- [0058] Das erfundungsgemäße Verfahren kann in einfacher Weise zur Automatisierung der Stabilisierung und/oder Isolierung von Nukleinsäuren herangezogen werden. Die Vorteile des erfundungsgemäßen Verfahrens, nämlich Stabilisierung der Nukleinsäuren, Lyse der die Nukleinsäuren enthaltenden Probe in einem einzigen Schritt und/oder Isolierung der Nukleinsäuren aus der gleichen Lösung, Sedimentierung der Komplexe bestehend aus Nukleinsäure und kationischer Verbindung bei niedrigen g-Zahlen, Verwendung von geringen Mengen an Carrier-Nukleinsäuren oder Carrier-Hilfen oder gar keiner Carrier-Nukleinsäuren oder Carrier-Hilfen, sowie geringer Volumina der kationischen Verbindung sowie geringer Probenvolumina nach der Pelletierung, tragen einzeln und umso mehr in Kombination miteinander zur vereinfachten Automatisierung bei. Die Durchführung in z.B. einem Multi-Well-Modul, wie beispielsweise einem 8-Well oder 96-Well Modul ist ebenfalls möglich.
- [0059] Die vorliegende Erfundung soll im Rahmen der folgenden Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.
- [0060] Lineare, verzweigte und cyclische kationische Verbindungen werden gemäß den Beispielen 1 oder 2 hergestellt. Zur Bindung der Reste R_A und R_{Bk} (für $k=1$ wird R_C anstelle von R_{Bk} verwendet) durch nukleophile Substitution an die Stickstoff-Atome wurden tertiäre Diamine oder tertiäre Polyamine ($k>1$) mit einer vorbestimmten Zahl an tertiären Stickstoff-Atomen in Lösung mit einem Überschuß an Alkylhalogenid unter Argon-Schutzgas versetzt. Die Stickstoff-Atome sind dabei durch lineare (unverzweigte) Alkandiyl-Brücken oder substituierte Xylylen-Brücken der entsprechenden Länge n miteinander verbunden. Diese an sich bekannte Reaktion zur Quaternierung wurde bei erhöhten Temperaturen durchgeführt. Alkylhalogenide, wie z.B. Alkylbromid oder Alkyliodid wurden im Überschuß verwendet, um zum größten Teil vollständig quaternierte Ammonium-Salze herzustellen. Die so erhaltenen Ammonium-Verbindungen wurden durch Rekristallisation aus verschiedenen Lösungsmitteln und Lösungsmittelgemischen, wie zum Beispiel Diethylether/Methanol, gereinigt.
- [0061] Alternativ wurden kationische Verbindungen mit zwei kationischen Stickstoff-Atomen ($k=1$) synthetisiert. Dabei wurden primäre α,ω -Alkanyldihalogenide unter den Reaktionsbedingungen gemäß Beispiel 1 mit einem Überschuß an Alkyldimethylamin umgesetzt. Die Alkyl-Kette der Amin-Verbindung kann hydroxyliert sein, weist aber keine Halogen-Atome auf. Die Reinigung der kationischen Verbindungen erfolgt wie oben beschrieben.
- [0062] Ein Austausch der Gegenionen (Anionen A) kann mit Hilfe einer Ionenaustauschersäule erfolgen. Exemplarisch ist in Beispiel 3 der Austausch von Bromid gegen Acetat beschrieben.

Beispiel 1: Synthese von Ethandiyl-1,2-bis(dimethyl-decyl-ammoniumbromid)

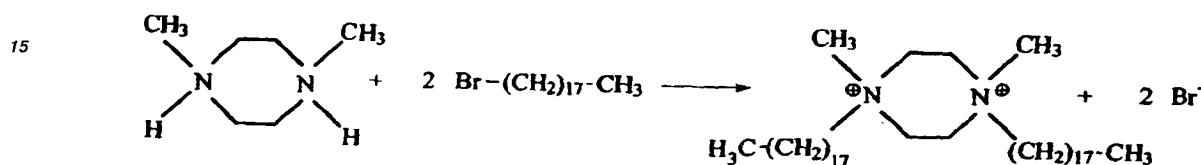


- [0064] In einem 2l Rundkolben mit Rückflußkühler, Heizpilz und Magnetrührer wurde eine Lösung von 46,0 ml N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (35,4 g, 0,30 mol) und 151,4 ml 1-Bromdekan (161,8 g, 0,73 mol, 20% Überschuß) in 850 ml Acetonitril und 280 ml Aceton für 42 h auf Rückflußtemperatur erhitzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt und dann eisgekühlt um die Kristallisation der Reaktionsprodukte zu vervollständigen. Die Kristallmasse wurde dann abgenutscht und zweimal mit insgesamt 200 ml kaltem Aceton gewaschen. Das feste Reaktionsprodukt wurde dann in einen 2l Rundkolben mit Rückflußkühler überführt und mit 1,8 l Diethylether versetzt. Nachdem die Rückflußtemperatur erreicht war wurden bis zur vollständigen Auflösung des Feststoffs kleine Men-

EP 1 031 626 A1

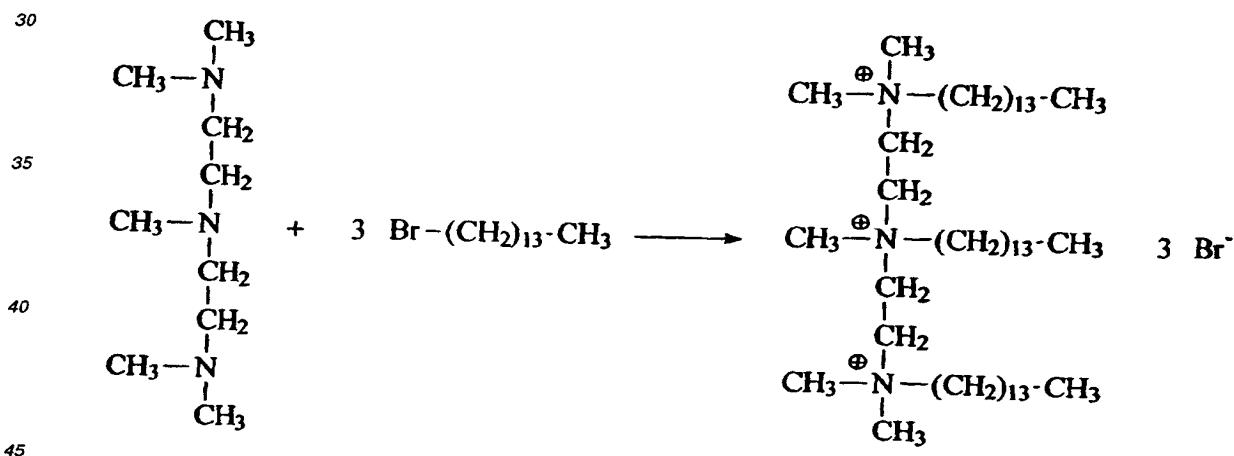
gen Methanol zugegeben. Insgesamt wurden dabei rund 350 ml Methanol zugegeben. Das Produkt kristallisierte über Nacht bei 4 °C aus und wurde dann abgenutscht und im Vakuumtrockenschränk bei 60 °C getrocknet. Die erste Fraktion ergaben 102 g trockenes Produkt (60% theoret. Ausbeute). Eine zweite Fraktion aus dem Reaktionsansatz ergaben nach dem Umkristallisieren 1,8 g trockenes Produkt. Die DC-Analyse des trockenen Produkts (Silica RP18 Platte; mobile Phase: Chloroform 25%, Methanol 16%, n-Propanol 25%, Ethylacetat 25%, 0,25%ige wässrige Kaliumchlorid-Lösung 9%) ergab nach Anfärbung in der Iodkammer einen neuen Substanzfleck. Edukte waren keine mehr vorhanden.

[0065] Analog zu der oben beschriebenen Darstellung von Ethandiyi-1,2-bis(dimethyl-decyl-ammoniumbromid) erfolgt die Darstellung der cyclischen Verbindungen, also der Verbindungen, in denen die Reste R_A und R_C zusammen 10 einen Rest R_{AC} bilden. Exemplarisch sei hier die Reaktionsgleichung der Darstellung von N,N'-Dioctadecyl-N,N'-dimethylpiperaziniumdibromid aus 1,4-Dimethylpiperazin und Octadecylbromid angegeben:



25 **Beispiel 2: Synthese von N,N',N''-Tritetradecyl-N,N,N',N'',N''-pentamethyl-bis-(2-ammonioethyl)-ammoniumbromid**

[0066]



50 **[0067]** In einem 2l Rundkolben mit Rückflußkühler, Heizpilz und Magnetrührer wurde eine Lösung von 20,9 ml N,N,N',N'',N''-pentamethyldiethylentriamin (17,3 g, 0,10 mol) und 93,5 ml 1-Bromtetradecan (99,8 g, 0,36 mol, 20% Überschuß) in 500 ml Acetonitril und 150 ml Aceton über 72 h auf Rückflußtemperatur erhitzt.

55 **[0068]** Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt und über Nacht bei 4°C gelagert um die Kristallisation der Reaktionsprodukte zu vervollständigen. Das kristallisierte Feststoff wurde abgenutscht und zweimal mit insgesamt 200 ml kaltem Aceton gewaschen. Der Feststoff wurde in einen 1l Rundkolben mit Rückflußkühler überführt, mit 1,8l Diethylether versetzt und auf Rückfluß erhitzt. Um den Feststoff komplett zu lösen wurde 250ml Methanol zugegeben. Die Lösung wurde dann auf Raumtemperatur abgekühlt und über Nacht bei 4°C gelagert. Das ausgefallene Produkt wurde abfiltriert und bei 60°C im Vakuumtrockenschränk getrocknet. Die Ausbeute betrug 60,1 g (59% der theoret. Ausbeute). Aus dem Filtrat des ursprünglichen Reaktionsansatzes konnten nach Umkristallisieren weitere 3,1 g Produkt erhalten werden. Die DC-Analyse (Silica RP18 Dünnschichtplatte; mobile Phase: Chloro-

form 25%, Methanol 16%, n-Propanol 25%, Ethylacetat 25%, 0,25%ige wäßrige Kaliumchlorid-Lösung 9%) zeigt nach Anfärben in der Iodkammer einen neuen Spot. Edukte konnten nicht mehr nachgewiesen werden.

Beispiel 3: Darstellung von kationischen Verbindungen mit Acetat als Gegenanion

[0069] Eine chromatographische Säule wurde mit 8g Dowex® 1x8-400 Anionentauscher gepackt. Die Säule wurde gründlich mit 50% wässrigem Methanol gewaschen bis das Eluat farblos war. Die Säule wurde dann mit insgesamt 20 Säulenvolumen einer 1M Essigsäure beladen, mit destilliertem Wasser bis zur Neutralität gewaschen und schließlich mit 10 Säulenvolumen 50 % wässrigem Methanol gespült. Nach diesen Waschschritten wurde eine Lösung von 1 g der kationischen Verbindung in der Bromidform in 2 ml 50 % wässrigem Methanol mit einer Flußrate von 1 ml/min auf die Säule gegeben. Die Verbindung wurde in 15 Säulenvolumen mit 50% wässrigem Methanol eluiert. Durch Gefriertrocknung wurde das Produkt aus dem Eluat isoliert. Gemäß den als Beispiel 1 angegebenen Reaktionen wurden die folgenden Verbindungen, die alle aus Diethylether/Methanol umkristallisiert wurden, hergestellt:

	Edukte		Reaktionszeit	Ausbeute	Produkt
20	Tetramethylethyldiamin	Octylbromid	42 h	45%	EthandiyI-1,2-bis(octyl dimethyl ammonium bromid)
25	Tetramethylethyldiamin	Decylbromid	42 h	65%	EthandiyI-1,2-bis(decyl dimethyl ammonium bromid)
30	Tetramethylethyldiamin	Dodecylbromid	42 h	63%	EthandiyI-1,2-bis(dodecyl dimethyl ammonium bromid)
35	Tetramethylethyldiamin	Tetradecylbromid	42 h	35%	EthandiyI-1,2-bis(tetradecyl dimethyl ammonium bromid)
40	Tetramethylethyldiamin	Hexadecylbromid	42 h	41%	EthandiyI-1,2-bis(hexadecyl dimethyl ammonium bromid)
45	Tetramethylethyldiamin	Octadecylbromid	42 h	14%	EthandiyI-1,2-bis(octadecyl dimethyl ammonium bromid)
	1,4-Dimethylpiperazin	Octadecylbromid	42 h	42%	N,N'-Dioctadecyl-N,N'-dimethyl piperazin-diumdibromid

5	Tetramethylpropandiamin	Decylbromid	42 h	77%	Propandiyl-1,3-bis(decyl dimethyl ammonium bromid)
10	Tetramethylpropandiamin	Dodecylbromid	42 h	85%	Propandiyl-1,3-bis(dodecyl dimethyl ammonium bromid)
15	Tetramethylpropandiamin	Tetradecylbromid	42 h	55%	Propandiyl-1,3-bis(tetradecyl dimethyl ammonium bromid)
20	Tetramethylpropandiamin	Hexadecylbromid	42 h	91%	Propandiyl-1,3-bis(hexadecyl dimethyl ammonium bromid)
25	Tetramethylpropandiamin	Octadecylbromid	42 h	87%	Propandiyl-1,3-bis(octadecyl dimethyl ammonium bromid)
30	Tetramethylbutandiamin	1-Brom-3-methylbutan	42h	98%	Ethandiyl-1,3-bis(3-methylbutyl dimethyl ammonium bromid)
35	Tetramethylbutandiamin	Decylbromid	42 h	78%	Butandiyl-1,4-bis(decyl dimethyl ammonium bromid)
40	Tetramethylbutandiamin	Dodecylbromid	42 h	82%	Butandiyl-1,4-bis(dodecyl dimethyl ammonium bromid)
45	Tetramethylbutandiamin	Tetradecylbromid	42 h	58%	Butandiyl-1,4-bis(tetradecyl dimethyl ammonium bromid)
50	Tetramethylbutandiamin	Hexadecylbromid	42 h	50%	Butandiyl-1,4-bis(hexadecyl dimethyl ammonium bromid)
	Tetramethylbutandiamin	Octadecylbromid	42 h	32%	Butandiyl-1,4-bis(octadecyl dimethyl ammonium bromid)
	Tetramethylbutandiamin	Eicosylbromid	42h	72%	Butandiyl-1,4-bis(eicosyl dimethyl ammonium bromid)
	Pentamethyldiethylenetriamin	Octylbromid	42 h	13%	N,N',N"-triocetyl-N,N,N',N"-pentamethyl-bis-(2-ammonioethyl)-ammoniumbromid

5	Pentamethyldiethylen-	Decylbromid	42 h	53%	N,N,N'-tridecyl-N,N,N',N"-pentamethyl- bis-(2-ammonioethyl)-ammoniumbromid
10	Pentamethyldiethylen-	Dodecylbromid	42 h	42%	N,N,N'-tridodecyl-N,N,N',N"-pentamethyl- bis-(2-ammonioethyl)-ammoniumbromid
15	Pentamethyldiethylen-	Tetradecylbromid	42 h	54%	N,N,N'-tritetradecyl-N,N,N',N"- pentamethyl-bis-(2-ammonioethyl)- ammoniumbromid
20	Pentamethyldiethylen-	Hexadecylbromid	42 h	58%	N,N,N'-trihexadecyl-N,N,N',N"- pentamethyl-bis-(2-ammonioethyl)- ammoniumbromid
25	Pentamethyldiethylen-	Octadecylbromid	42 h	30%	N,N,N'-trioctadecyl-N,N,N',N"- pentamethyl-bis-(2-ammonioethyl)- ammoniumbromid
30	Pentamethyldiethylen-	Eicosylbromid	42 h	38%	N,N,N'-tricosyl-N,N,N',N"-pentamethyl- bis-(2-ammonioethyl)-ammoniumbromid

35 [0070] Gemäß der angegebenen Alternative wurden die folgenden Verbindungen, die alle aus Diethylether/Methanol umkristallisiert wurden, hergestellt:

40	Edukte		Reaktionszeit	Ausbeute	Produkt
45	1,2-Dibromethan		Decylamin	48h	53% Ethandiyl-1,2-bis(decyl dimethyl ammonium bromid)
50	1,2-Dibromethan		Dodecylamin	48h	55% Ethandiyl-1,2-bis(dodecyl dimethyl ammonium bromid)

5	1,2-Dibromethan	Tetradecylamin	48h	53%	Ethandiy-1,2-bis(tetradecyl dimethyl ammonium bromid)
10	1,2-Dibromethan	Hexadecylamin	48h	50%	Ethandiy-1,2-bis(hexadecyl dimethyl ammonium bromid)
15	1,2-Dibromethan	Octadecylamin	48h	48%	Ethandiy-1,2-bis(octadecyl dimethyl ammonium bromid)
20	1,3-Dibrompropan	Decylamin	48h	68%	Propandiyl-1,3-bis(decyl dimethyl ammonium bromid)
25	1,3-Dibrompropan	Dodecylamin	48h	65%	Propandiyl-1,3-bis(dodecyl dimethyl ammonium bromid)
30	1,3-Dibrompropan	Tetradecylamin	48h	63%	Propandiyl-1,3-bis(tetradecyl dimethyl ammonium bromid)
35	1,3-Dibrompropan	Hexadecylamin	48h	64%	Propandiyl-1,3-bis(hexadecyl dimethyl ammonium bromid)
40	1,3-Dibrompropan	Octadecylamin	48h	60%	Propandiyl-1,3-bis(octadecyl dimethyl ammonium bromid)
45	1,4-Dibrombutan	Decylamin	48h	65%	Butandiyl-1,4-bis(decyl dimethyl ammonium bromid)
50	1,4-Dibrombutan	Dodecylamin	48h	66%	Butandiyl-1,4-bis(dodecyl dimethyl ammonium bromid)
	1,4-Dibrombutan	Tetradecylamin	48h	63%	Butandiyl-1,4-bis(tetradecyl dimethyl ammonium bromid)
	1,4-Dibrombutan	Hexadecylamin	48h	65%	Butandiyl-1,4-bis(hexadecyl dimethyl ammonium bromid)
	1,4-Dibrombutan	Octadecylamin	48h	60%	Butandiyl-1,4-bis(octadecyl dimethyl ammonium bromid)

Beispiel 4: Referenzbeispiel

[0071] Als Modell für die Isolierung von Virus RNA aus Plasma dient ein radioaktiv markiertes, 4,5 kB langes in vitro Transkript des Env-Genes aus der Maus. Die radioaktive Markierung erfolgt dabei durch den Einbau von $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP durch die T7-RNA-Polymerase in das RNA-Transkript.

Versuch A

- [0072]** In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß werden zu 140 μl Plasma 4 Volumen (560 μl) einer 3,6 %igen Lösung von Tetradecyltrimethylammonium Oxalat gegeben. In den Deckel des Reaktionsgefäßes wird Carrier RNA (poly A RNA einer Länge von 700 Basen bis zu 7 kB) in unterschiedlicher Menge gegeben, sowie radioaktiv markiertes Transkript. Der Deckel des Reaktionsgefäßes wird geschlossen, die Probe gut gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Komplexe bestehend aus RNA und kationischer Verbindung werden für 2 min bei 10000 $\times g$ sedimentiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 600 μl eines Guanidiniumthiocyanat haltigen Puffers resuspendiert und mit 1 Volumen 70 %igem Ethanol versetzt. Die Probe wird auf eine Silica-Membran enthaltende spin-Säule aufgetragen und mittels Zentrifugation für 1 min bei ca. 6000 $\times g$ durch die Membran hindurchgeführt. Die spin-Säule wird zweimal mit einem Ethanol und NaCl haltigen Puffer gewaschen, wobei der Puffer wiederum durch Zentrifugation für 1 min bei ca. 6000 $\times g$ durch die Membran geführt wird. Die Membran wird für 3 min bei 20 000 $\times g$ trockenzentrifugiert und die RNA mit 50 μl RNase freiem Wasser mittels Zentrifugation für 1 min bei ca. 10 000 $\times g$ eluiert.
- [0073]** Während des Prozesses werden alle Fraktionen (Überstand, Durchbruch, Waschpuffer, spin-Säule und Eluat) gesammelt und anschließend wird die Verteilung des radioaktiv markierten Transkriptes in den einzelnen Fraktionen durch Messung in einem Szintillationszähler bestimmt.

Tabelle 1

Verteilung der radioaktiv markierten RNA im Überstand und im Eluat in Abhängigkeit von der Carriermenge. Die Differenz zu 100 % ergibt sich aus den Anteilen an RNA in den übrigen Fraktionen (Spin-Säule und Waschpuffer).		
Carriermenge/ μg	RNA im Überstand/%	RNA im Eluat/%
0	83	3
2,5	79	13
5	63	26
7,5	49	39
10	30	55
25	8	75

Versuch B

- [0074]** In einem 15 ml Reaktionsgefäß wird zu 1 ml Plasma 2 ml einer 3,6 %igen Lösung von Tetradecyltrimethylammonium Oxalat gegeben. In den Deckel des Reaktionsgefäßes wird Carrier RNA (poly A RNA einer Länge von 700 Basen bis zu 7 kB) in unterschiedlicher Menge gegeben, sowie radioaktiv markiertes Transkript. Der Deckel des Reaktionsgefäßes wird geschlossen, die Probe gut gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Komplexe bestehend aus RNA und kationischer Verbindung werden für 10 bis 40 min bei ca. 4500 $\times g$ sedimentiert.
- [0075]** Anschließend wird der Anteil des radioaktiv markierten Transkriptes im Sediment und im Überstand durch Messung in einem Szintillationszähler bestimmt.

50

55

Tabelle 2

Anteil radioaktiv markierter RNA (in %) im Sediment in Abhängigkeit von der Carriermenge sowie der Zentrifugationszeit. Die Differenz zu 100 % ergibt sich aus dem Anteil an RNA im Überstand.			
Zentrifugationszeit/min	50 µg Carrier	100 µg Carrier	150 µg Carrier
10	22 %	nd	nd
20	31 %	79 %	84 %
30	36 %	nd	nd
40	46 %	89 %	91 %

5

10

15

20

25

30

35

40

45

[0076] Die beiden Versuche zeigen, daß sowohl sehr hohe Cariermengen als auch hohe g-Zahlen nötig sind, um die RNA/Tetradecyltrimethylammonium Oxalat-Komplexe zu pelletieren.

Beispiel 5:

[0077] Die Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens werden in den folgenden Beispielen dargestellt.

[0078] Als Modell für die Isolierung von Virus RNA aus Plasma dient ein radioaktiv markiertes 4,5 kB langes in vitro Transkript des Evx-Genes aus der Maus. Die radioaktive Markierung erfolgt dabei durch den Einbau von alpha ³²P-UTP durch die T7-RNA-Polymerase in das RNA-Transkript.

[0079] In einem 15 ml Reaktionsgefäß werden zu 1 ml Plasma 1 ml einer 0,5 %igen Lösung von Ethandiy-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid) gegeben. In den Deckel des Reaktionsgefäßes wird Carrier RNA (poly A RNA einer Länge von 700 Basen bis zu 7 kB) in unterschiedlicher Menge gegeben, sowie radioaktiv markiertes Transkript. Der Deckel des Reaktionsgefäßes wird geschlossen, die Probe gut gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Komplexe bestehend aus RNA und kationischer Verbindung werden für 20 min bei ca. 4500 x g sedimentiert.

[0080] Anschließend wird der Anteil des radioaktiv markierten Transkriptes im Sediment und im Überstand durch Messung in einem Szintillationszähler bestimmt.

Tabelle 3

Anteil radioaktiv markierter RNA (in %) im Sediment in Abhängigkeit von der Carriermenge sowie der Zentrifugationszeit. Die Differenz zu 100 % ergibt sich aus dem Anteil an RNA im Überstand.	
Carriermenge/µg	RNA im Sediment/% %
0	95 %
5	96 %
10	94 %

50

[0081] Trotz geringer oder gar keiner Carriermengen und einer Sedimentation der Komplexe bestehend aus RNA und kationischer Verbindung bei niedrigen g-Zahlen wird eine hohe RNA-Ausbeute im Sediment erhalten.

Beispiel 6: Konzentrierung der Komplexe bestehend aus RNA und kationischer Verbindung auf unterschiedlichen Membranen

[0082] Es wird 200 µl Plasma mit 200 µl einer 1 %igen Lösung von Ethandiy-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid) gemischt. In den Deckel des Reaktionsgefäßes wird radioaktiv markiertes Transkript gegeben (s. Beispiel 5). Es wird keine zusätzliche Carrier-RNA zugesetzt. Der Deckel des Reaktionsgefäßes wird geschlossen, die Probe gut gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Komplexe bestehend aus RNA und kationischer Verbindung werden auf unterschiedlichen Membranen konzentriert, indem sie durch Zentrifugation für 2 min bei 10000 x g in spin-Säulen, die eine entsprechende Membran enthalten, die zur mechanischen Unterstützung auf einer Polypropylenfritte plaziert wird und mit einem Spannring fixiert wird, durch diese Membran geführt werden. Die löslichen Bestand-

teile binden hierbei nicht an der Membran.

[0083] Anschließend wird der Anteil des radioaktiv markierten Transkriptes im Durchbruch und auf der spin-Säule durch Messung in einem Szintillationszähler bestimmt.

5

Tabelle 4

Anteil radioaktiv markierter RNA (in %), die auf der entsprechenden Membran zurückgehalten wurde. Die Differenz zu 100 % ergibt sich aus dem Anteil an RNA im Durchbruch. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.		
	Membran	Ausbeute
10	Pall Hydrolon HNPH 3R 3µm Porengröße Nylon, hydrophob	21 % 20 %
	Pall Hydrolon 1,2 µm Porengröße Nylon, hydrophob	39 % 38 %
15	Pall (FluoRepel) Supor 450 Polyethersulfon, hydrophob	43 % 46 %
	Pall Fluorotrans PVDF 0,2 µm Polyvinylidendifluorid, hydrophob	40 % 40 %

25 [0084] Das Ergebnis zeigt, daß die Komplexe aus Nukleinsäure und der kationischen Verbindung auch auf geeigneten Membranen aufkonzentriert werden können.

Beispiel 7: Isolierung von RNA aus Plasma durch Komplexierung mit kationischen Verbindungen und nachfolgender Aufreinigung an einer Silica-Membran

30 [0085] In einem 2 ml Reaktionsgefäß wird zu 1 ml Plasma 1 ml Lysepuffer zugeben, der neben 1 - 20 % (w/v) Ethandiy-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid) noch Harnstoff in einer Konzentration von 1 - 6 M, und/oder Tributyl-Phosphat in einer Konzentration von 0,1 - 1 % (v/v), und/oder Dithiothreitol in einer Konzentration von 5 - 40 mM, und/oder Isopropanol in einer Konzentration von 10 - 50 % (w/v) enthalten kann. In den Deckel des Reaktionsgefäßes wird radioaktives Transkript, sowie 10 µg poly A-Carrier-RNA pipettiert (siehe Beispiel 4); der Deckel geschlossen und der Ansatz gut gemischt. Der Ansatz wird 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Komplexe aus RNA und kationischer Verbindung werden in der Eppendorf Zentrifuge 5417 für 3 min bei 3000 rpm = ca. 1000 x g sedimentiert und der Überstand abpipettiert. Das Pellet wird in 500 µl eines Trishydroxymethylaminomethan (Tris HCl) Puffers mit einem pH-Wert von 6 - 8 und mit hoher Salzkonzentration z.B. 2 - 5 M LiCl 2 - 5 M Natriumacetat, 4 - 6 M Guanidiniumthiocyanat, oder 2 - 6 M Guanidinhydrochlorid (GuHCl) gelöst. Zur besseren Resuspendierung des Pellets kann der Puffer auf 60°C erwärmt werden. Außerdem kann dem Puffer Proteinase K zugegeben (400 µg) und der Ansatz dann für 10 min bei 60°C inkubiert werden. Dann wird 500 µl einer Lösung, die 40 - 98 % (v/v) Ethanol enthält, zugegeben. Eine oder beide Lösungen können darüber hinaus auch ein nicht ionisches, oder zwitterionisches Detergenz, wie z.B. Triton® X-100, Nonidet-P40, TWEEN® 20, CHAPSO oder ZWITTERGENT® 3-12 in einem Konzentrationsbereich von 1 - 20 % enthalten. Die Lösung wird auf eine Silica-Membran enthaltende spin-Säule geladen und durch Zentrifugation für 1 min bei ca. 3700 x g durch die Membran geführt. Die spin-Säule wird zweimal mit jeweils 700 µl eines Ethanol und NaCl haltigen Waschpuffers gewaschen, wobei der Waschpuffer mit Zentrifugation bei 10 000 x g durch die Membran geführt wird. Die spin-Säule wird für 3 min bei 20 000 x g trockenentrifugiert, und die RNA in zwei Schritten mit je 30 µl Wasser von der Silica-Membran eluiert.

40 [0086] Während des Prozesses werden alle Fraktionen (Überstand, Durchbruch, spin-Säule und gesammelt und anschließend wird die Verteilung des radioaktiv markierten Transkriptes in den einzelnen Fraktionen durch Messung in einem Szintillationszähler bestimmt.

45 [0087] In Tabelle 5 sind exemplarisch Ergebnisse von unter den oben genannten Bedingungen durchgeführten Aufreinigungen von radioaktiv markierter RNA aus Plasma dargestellt.

55

Tabelle 5: Ausbeute an radioaktiv markierter RNA im Eluat.
 Die Angaben erfolgen in Prozent der eingesetzten Gesamtmenge
 5 radioaktiver RNA. Die Differenz zu 100 % ergibt sich aus den
 Anteilen an RNA in den übrigen Fraktionen (Überstand,
 Durchbruch und Spin-Säule).

	Lysepuffer	Aufreinigungspuffer	Ausbeute
10	1 % EthandiyI-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 50 mM Tris HCl pH 7,5	2 M GuHCl 50 mM Tris HCl pH 7,5 80 % (v/v) Ethanol	42 %
15	1 % EthandiyI-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 50 mM Tris HCl pH 7,5	3 M GuHCl 50 mM Tris HCl pH 7,5 80 % (v/v) Ethanol	45 %
20	1 % EthandiyI-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 50 mM Tris HCl pH 7,5	5 M GuHCl 50 mM Tris HCl pH 7,5 80 % (v/v) Ethanol	53 %
25	1 % EthandiyI-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 50 mM Tris HCl pH 7,0	6 M GuHCl 50 mM Tris HCl pH 7,0 40 % (v/v) Ethanol	40 %
30	1 % EthandiyI-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 50 mM Tris HCl pH 7,0	6 M GuHCl 50 mM Tris HCl pH 7,0 60 % (v/v) Ethanol	32 %
35	1 % EthandiyI-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 50 mM Tris HCl pH 7,0	6 M GuHCl 50 mM Tris HCl pH 7,0 80 % (v/v) Ethanol	24 %
40	1 % EthandiyI-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 50 mM Tris HCl pH 7,0	6 M GuHCl 50 mM Tris HCl pH 7,0 98 % (v/v) Ethanol	31 %
45	20 % EthandiyI-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 50 mM Tris HCl pH 7,0, 3 M Hamstoff	6 M GuHCl 50 mM Tris HCl pH 7,0 80 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Nonidet P40	50 %

50

55

5	20 % EthandiyI-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 50 mM Tris HCl pH 7,0, 6 M Hamstoff	6 M GuHCl 50 mM Tris HCl pH 7,0 80 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Nonidet P40	32 %
10	5 % EthandiyI-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 50 mM Tris HCl pH 7,0, 3 M Hamstoff, 0,2 % (v/v) Tributylphosphat	6 M GuHCl 50 mM Tris HCl pH 7,0 80 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Nonidet P40	64 %
15	5 % EthandiyI-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 50 mM Tris HCl pH 7,0, 3 M Hamstoff, 0,6 % (v/v) Tributylphosphat	6 M GuHCl 50 mM Tris HCl pH 7,0 80 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Nonidet P40	50 %
20	5 % EthandiyI-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 50 mM Tris HCl pH 7,0, 3 M Hamstoff, 0,8 % (v/v) Tributylphosphat	6 M GuHCl 50 mM Tris HCl pH 7,0 80 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Nonidet P40	36 %
25	1 % EthandiyI-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 50 mM Tris HCl pH 7,0, 3 M Hamstoff, 30 % (v/v) Isopropanol	6 M GuHCl 50 mM Tris HCl pH 7,0, 5 % (v/v) Nonidet P40 80 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Nonidet P40	66 %
30	1 % EthandiyI-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 50 mM Tris HCl pH 7,0, 3 M Hamstoff, 40 % (v/v) Isopropanol	6 M GuHCl 50 mM Tris HCl pH 7,0, 5 % (v/v) Nonidet P40 80 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Nonidet P40	49 %
35	2 % EthandiyI-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 50 mM Tris HCl pH 7,0, 3 M Hamstoff, 30 % (v/v) Isopropanol, 10 mM Dithiotreitol	6 M GuHCl 50 mM Tris HCl pH 7,0, 5 % (v/v) Nonidet P40 80 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Nonidet P40	65 %
40	2 % EthandiyI-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 50 mM Tris HCl pH 7,0, 4 M Hamstoff, 30 % (v/v) Isopropanol, 5 mM Dithiotreitol, 0,3 % (v/v) Tributylphosphat	6 M GuHCl 50 mM Tris HCl pH 7,0, 5 % (v/v) Nonidet P40 80 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Nonidet P40	71 %
45	2 % EthandiyI-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 50 mM Tris HCl pH 7,0, 4 M Hamstoff, 30 % (v/v) Isopropanol, 5 mM Dithiotreitol, 0,3 % (v/v) Tributylphosphat	6 M GuHCl 50 mM Tris HCl pH 7,0, 1 % (v/v) Nonidet P40, 400 µg Proteinase K 80 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Nonidet P40	78 %
50	1 % EthandiyI-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 50 mM Tris HCl pH 7,5	2 M LiCl 50 mM Tris HCl pH 7,5 80 % (v/v) Ethanol	39 %
	1 % EthandiyI-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 50 mM Tris HCl pH 7,5	5 M LiCl 50 mM Tris HCl pH 7,5 80 % (v/v) Ethanol	38 %
	2 % EthandiyI-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 50 mM Tris HCl pH 7,5	2 M Natriumacetat pH 6,5 70 % (v/v) Ethanol	31 %
	2 % EthandiyI-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 50 mM Tris HCl pH 7,5	4 M Natriumacetat pH 6,5 70 % (v/v) Ethanol	30 %

5	1 % Ethandiy-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 50 mM Tris HCl pH 7,5	4 M Guanidiniumthiocyanat, 50 mM Tris HCl pH 7,0 80 % (v/v) Ethanol	59 %
10	1 % Ethandiy-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 50 mM Tris HCl pH 7,5	6 M Guanidiniumthiocyanat, 50 mM Tris HCl pH 7,0 80 % (v/v) Ethanol	46 %
15	1 % Ethandiy-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 50 mM Tris HCl pH 7,5	5,5 M Guanidiniumthiocyanat, 40 mM Natriumcitrat pH 7,5, 1 % (v/v) Triton® X-100 98 % (v/v) Ethanol	34 %
20	1 % Ethandiy-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 50 mM Tris HCl pH 7,5	5,5 M Guanidiniumthiocyanat, 40 mM Natriumcitrat pH 7,5, 5 % (v/v) Triton® X-100 80 % (v/v) Ethanol	43 %
25	1 % Ethandiy-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 50 mM Tris HCl pH 7,5	5,5 M Guanidiniumthiocyanat, 40 mM Natriumcitrat pH 7,5, 1 % (v/v) TWEEN® 20 80 % (v/v) Ethanol	20 %
30	1 % Ethandiy-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 50 mM Tris HCl pH 7,5	5,5 M Guanidiniumthiocyanat, 40 mM Natriumcitrat pH 7,5, 3 % (v/v) TWEEN® 20 98 % (v/v) Ethanol	20 %
35	1 % Ethandiy-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 50 mM Tris HCl pH 7,5	5,5 M Guanidiniumthiocyanat, 40 mM Natriumcitrat pH 7,5, 3 % (w/v) ZWITTERGENT® 3-12 98 % (v/v) Ethanol	56 %
40	1 % Ethandiy-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 50 mM Tris HCl pH 7,5	5,5 M Guanidiniumthiocyanat, 40 mM Natriumcitrat pH 7,5, 5 % (w/v) ZWITTERGENT® 3-12 98 % (v/v) Ethanol	37 %
45	1 % Ethandiy-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 50 mM Tris HCl pH 7,5	5,5 M Guanidiniumthiocyanat, 40 mM Natriumcitrat pH 7,5, 1 % (w/v) CHAPSO 98 % (v/v) Ethanol	22 %
50	1 % Ethandiy-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 50 mM Tris HCl pH 7,5	5,5 M Guanidiniumthiocyanat, 40 mM Natriumcitrat pH 7,5, 3% (w/v) CHAPSO 98 % (v/v) Ethanol	19 %

Beispiel 8: Isolierung von Gesamt-RNA aus HeLa-Zellen

[0088] Ein Zellpellet bestehend aus 1×10^7 exp.7 HeLa-Zellen aus einer Suspensionskultur wird in 1 ml einer 2%igen Lösung (w/v) von Ethandiy-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), gepuffert mit einem Tris-HCl Puffer pH 7,0 und versetzt mit 10 µl β-Mercaptoethanol pro ml Lösung aufgenommen, mittels eines Polytron-Homogenisators in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß zerkleinert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

[0089] Dann wird die Lösung für 3 min bei ca. 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Sediment in 200 µl einer Lösung bestehend aus 4 M Guanidin-thiocyanat, 0,2 M Natriumacetat und 10 % (v/v) Nonidet P40 gelöst. Anschließend werden 100 µl saures Phenol zugegeben und die Lösung wird durch kräftiges Schütteln extrahiert. Nach Zugabe von 100 µl Chloroform wird die Lösung abermals durch kräftiges Schütteln extrahiert und zur Phasentrennung für 1 min. mit 20000 x g zentrifugiert. Die wässrige Phase wird abgenommen und mit 100 µl Chloroform reextrahiert wie oben beschrieben. Die wässrige Phase wird abgenommen und die Nukleinsäuren werden durch Zugabe von 200 µl Isopropanol für 30 min bei -20°C ausgefällt. Die ausgefällten Nukleinsäuren werden durch Zentrifugation für 5 min mit 20000 x g sedimentiert, der Überstand wird abgenommen, das Nukleinsäure-Sediment wird einmal mit einer 80 %igen Ethanol-Lösung gewaschen, getrocknet und in RNase-freiem Aqua dest. gelöst.

[0090] Die Menge an isolierter Nukleinsäure wird durch Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt, und die Reinheit der Nukleinsäure wird durch die Bestimmung des Verhältnisses der Lichtabsorption

bei 260 nm und 280 nm ermittelt (s. Tabelle 6).

Tabelle 6

RNA-Ausbeute und Reinheit bei Einsatz von 1 x 10 exp. 7 HeLa-Zellen.			
Zur Bestimmung der Ausbeute wird der Berechnungsfaktor für die RNA herangezogen (1 OD _{260nm} = 40 µg/ml), die OD-Messung erfolgt in Wasser. Es wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt.			
	Proben Nr.	Ausbeute/µg	OD 260nm/280nm
1	1	51,2	1,85
10	2	135	1,66
15	3	77,9	1,69

[0091] Das Ergebnis liegt im Rahmen der Erwartungen an Gesamt-RNA, die man aus 10 exp. 7 HeLa-Zellen isolieren kann.

Beispiel 9: Isolierung von Gesamt-RNA aus Mausniere

[0092] Jeweils 20 mg Nierengewebe wird in 1 ml einer Lösung, die 2 % (w/v) Ethandiyyl-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid) sowie 3 M Urea und 10 µl β-Mercaptoethanol pro ml Lösung enthält und gepuffert wird durch einen 50 mM Tris-HCl Puffer pH 7,0, mittels eines Polytron-Homogenisators in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß zerkleinert und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wird dann für 3 min bei ca. 1000 x g zentrifugiert.

[0093] Der Überstand wird abgenommen und das Sediment in 200 µl einer Lösung bestehend aus 4 M Guanidin-thiocyanat, 0,2 M Natriumacetat und 10 % (v/v) Nonidet P40 gelöst. Anschließend werden 100 µl saures Phenol zugegeben und die Lösung wird durch kräftiges Schütteln extrahiert. Nach Zugabe von 100 µl Chloroform wird die Lösung abermals durch kräftiges Schütteln extrahiert und zur Phasentrennung für 1 min. mit 20000 x g zentrifugiert. Die wässrige Phase wird abgenommen und mit 100 µl Chloroform reextrahiert wie oben beschrieben. Die wässrige Phase wird abgenommen und die Nukleinsäuren werden durch Zugabe von 200 µl Isopropanol für 30 min bei -20°C ausgefällt. Die ausgefällten Nukleinsäuren werden durch Zentrifugation für 5 min mit 20000 x g sedimentiert, der Überstand wird abgenommen, das Nukleinsäure-Sediment wird einmal mit einer 80 %igen Ethanol-Lösung gewaschen, getrocknet und in RNase-freiem Aqua dest. gelöst.

[0094] Die Menge an isolierter Nukleinsäure wird durch Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt, und die Reinheit der Nukleinsäure wird durch die Bestimmung des Verhältnisses der Lichtabsorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt (s. Tabelle 7).

Tabelle 7

RNA-Ausbeute und Reinheit bei Einsatz von 20 mg Nierengewebe. Zur Bestimmung der Ausbeute wird der Berechnungsfaktor für die RNA herangezogen (1 OD _{260nm} = 40 µg/ml), die Messung erfolgt in Wasser. Es wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt.			
	Proben Nr.	Ausbeute/µg	OD 260nm/280nm
1	1	220	1,31
45	2	207	1,90
50	3	256	2,26

Beispiel 10

Aufreinigung von RNA aus Plasma durch eine Komplexierung mit kationischen Verbindungen und anschließender Phenol/Chloroform Extraktion

[0095] Als Modell für eine virale RNA (z.B. HCV- oder HIV-RNA) wird HeLa-RNA in eine Mischung aus 140 µl Blutplasma und 140 µl einer Lösung aus 2 % (w/v) Ethandiyyl-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), gepuffert mit 50 mM Tris-HCl, pH 7,0, gegeben und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wird dann für 3 min

bei ca. 1000 x g zentrifugiert.

[0096] Der Überstand wird abgenommen und das Sediment in 200 µl einer Lösung bestehend aus 4 M Guanidin-thiocyanat, 0,2 M Natriumacetat und 10 % (v/v) Nonidet P40 gelöst. Anschließend werden 100 µl saures Phenol zugegeben und die Lösung wird durch kräftiges Schütteln extrahiert. Nach Zugabe von 100 µl Chloroform wird die Lösung

5 abermals durch kräftiges Schütteln extrahiert und zur Phasentrennung für 1 min. mit 20000 x g zentrifugiert. Die wässrige Phase wird abgenommen und mit 100 µl Chloroform reextrahiert wie oben beschrieben. Die wässrige Phase wird abgenommen und die Nukleinsäuren werden durch Zugabe von 200 µl Isopropanol für 30 min bei -20°C ausgefällt. Die ausgefällten Nukleinsäuren werden durch Zentrifugation für 5 min mit 20000 x g sedimentiert, der Überstand wird abgenommen, das Nukleinsäure-Sediment wird einmal mit einer 80 %igen Ethanol-Lösung gewaschen, getrocknet und

10 in RNase-freiem Aqua dest. gelöst.

[0097] Die Menge an isolierter Nukleinsäure wird durch Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt, und die Reinheit der Nukleinsäure wird durch die Bestimmung des Verhältnisses der Lichtabsorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt (s. Tabelle 8).

15

Tabelle 8

20	RNA-Ausbeute und Reinheit. Zur Bestimmung der Ausbeute wird der Berechnungsfaktor für RNA herangezogen ($1 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 40 \mu\text{g/ml}$), die Messung erfolgt in Wasser. Es wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt.		
25	Proben Nr.	Ausbeute/µg	OD 260nm/280nm
	1	13,3	1,73
	2	18,7	1,72
	3	16,4	1,91

Beispiel 11:

30 [0098] Isolierung von RNA durch eine Komplexierung mit kationischen Verbindungen und nachfolgender Aufreinigung mittels Membrantechnologien, die in der Patentanmeldung Aktenzeichen PCT/EP98/06756 beschrieben werden.

[0099] Je 10 µg RNA in 100 µl Wasser werden mit 100 µl einer 2 %igen EthandiyI-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid) Lösung in 50 mM Tris-HCl pH 7,0 versetzt und für 10 min in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wird anschließend für 3 min bei 20000 x g zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in 300 µl einer Lösung aus 6 M Guanidinhydrochlorid, 50 mM Tris-HCl, pH 7,0, und 1 % (v/v) Nonidet P40 gelöst. Nach Zugabe von 300 µl einer Lösung aus 80 % Ethanol und 10 % Nonidet P40 (v/v) werden die Ansätze in einer Plastiksäule, die eine Polypropylenfratte zur mechanischen Unterstützung enthält, auf der eine Membran zur Bindung der Nukleinsäuren mittels eines Spannringes fixiert ist, mittels Zentrifugation bei 10000 x g für eine Minute durch die Membran hindurchgeführt. Als Membranen werden eingesetzt:

40

1. Pall Fluoro Trans G, Polyvinylidendifluorid, hydrophob, Porengröße 0,2 µm
2. GORE-TEX Polyester-Vlies 9318, Polytetrafluorethylen, hydrophil, Porengröße 3 µm
3. Millipore Fluropore PTFE, Polytetrafluorethylen, hydrophob, Porengröße 3 µm

45 [0100] Der Durchfluß wird in einem Sammelrörchen aufgefangen und verworfen. Die Membranen werden nacheinander mit 600 µl eines Guanidin-thiocyanat haltigen Puffers und danach mit einem Guanidin-thiocyanat freien Puffer gewaschen. Dabei werden die Waschpuffer jeweils durch Zentrifugation bei 10000 x g durch die Membran geführt. Nach der zweiten Waschung werden die Membranen für 2 min bei 20000 x g trockenzentrifugiert. Dann wird die RNA

50 durch Aufpipettieren von 70 µl Wasser auf die Membran und Inkubation für 2 min bei Raumtemperatur von der Membran eluiert. Das Eluat wird mit einer Pipette von oben von der Membran abpipettiert. Die Elution wird nochmals mit 70 µl Wasser wiederholt, die Eluate werden vereinigt.

[0101] Die Menge an isolierter RNA wird durch Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt, und die Reinheit der RNA wird durch die Bestimmung des Verhältnisses der Lichtabsorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt (s. Tabelle 9).

55

Tabelle 9

RNA-Ausbeute und Reinheit. Zur Bestimmung der Ausbeute wird der Berechnungsfaktor für RNA herangezogen (1 OD260nm = 40 µg/ml). Die Messung erfolgt in Wasser. Es werden jeweils Vierfachbestimmungen durchgeführt.				
	Membran	Ausbeute/µg	OD 260nm/280nm	
5	Pall Fluoro Trans G	4,95	1,96	
		2,32	1,99	
		4,73	1,96	
		2,49	1,98	
10	GORE-TEX Polyester Vlies 9318	3,25	1,90	
		3,07	1,80	
		1,52	1,66	
		2,57	1,88	
15	Millipore Fluropore PTFE	4,32	1,99	
		7,08	1,99	
		7,66	1,97	
		7,25	1,98	
20				
25				

Beispiel 12: Stabilisierung von RNA in Blut mittels kationischer Verbindungen mit zwei oder mehr Ammoniumzentren

[0102] Jeweils 200 µl frisches Blut werden mit 600 µl einer Lösung aus:

- 2 % (w/v) Ethandiyyl-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid) in 200 mM Natriumcitrat pH 3,0
- 2 % (w/v) Propandiyyl-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid) in 200 mM Natriumcitrat pH 3,0
- 2 % (w/v) Ethandiyyl-1,2-bis(dimethyltetradecylammoniumbromid) in 200 mM Natriumcitrat pH 3,0
- 2 % (w/v) N,N',N"-tridecyl-N,N,N',N"-pentamethyl-bis-(2-ammonioethyl)ammoniumbromid in 200 mM Natriumcitrat pH 3,0

versetzt und für 48 h bei Raumtemperatur gelagert. Alle Ansätze wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

[0103] Zur Isolierung der RNA werden die Proben für 2 min bei 1000 x g zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in 700 µl einer Lösung aus 6 M Guanidinhydrochlorid, 200 mM Tris-HCl pH 7,0 und 1 % (v/v) Nonidet P40 gelöst. Dann werden 80 µg Proteinase K zugegeben und die Ansätze werden für 30 min bei 40°C inkubiert. Es werden jeweils 350 µl saures Phenol zugegeben und die Ansätze werden durch kräftiges Schütteln extrahiert. Nach Zugabe von 350 µl Chloroform und erneuter Extraktion werden die Ansätze zur Trennung der Phasen für 3 min bei 14000 x g zentrifugiert. Die wässrige Phase wird abgenommen und nochmals mit 700 µl Chloroform extrahiert. Nach erneuter Zentrifugation wird wieder die wässrige Phase abgenommen und die RNA durch Zugabe von 70 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 700 µl Isopropanol für 30 min bei -20°C ausgefällt. Die RNA wird für 10 min bei 20000 x g abzentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Pellet einmal mit 600 µl 80 % (v/v) Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 100 µl RNase freiem Wasser zurückgelöst.

[0104] Die Menge an isolierter RNA wird durch Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt, und die Reinheit der RNA wird durch die Bestimmung des Verhältnisses der Lichtabsorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt (s. Tabelle 10).

Tabelle 10

RNA-Ausbeute und Reinheit. Zur Bestimmung der Ausbeute wird der Berechnungsfaktor für RNA herangezogen (1 OD _{260nm} = 40 µg/ml). Es werden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.			
	Kationische Verbindung	Ausbeute/µg	OD 260nm/280nm
5	Ethandiyl-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid)	0,36	1,24
		0,60	1,14
10	Propandiyl-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid)	3,2	1,01
		0,72	1,1
15	Ethandiyl-1,2-bis(dimethyltetradecylammoniumbromid)	0,96	1,15
		1,2	1,05
20	N,N',N"-tridecyl-N,N,N',N"-pentamethyl-bis-(2-ammonioethyl)ammoniumbromid	0,72	1,17
		1,8	0,72

Beispiel 13: Isolierung von RNA mittels kationischer Substanzen mit zwei oder mehr Ammoniumzentren

[0105] Je 25 µg reine HeLa-RNA, gelöst in 140 µl Wasser, wird mit 140 µl der Substanzen in unterschiedlicher Konzentration von 1 - 15 % (w/v), gelöst in Wasser, versetzt und bei RT für 10 min inkubiert, die Substanz-RNA-Komplexe werden für 10 min bei 5000 x g abzentrifugiert, in 150 µl eines Puffers bestehend aus 3,5 M Guanidiniumthiocyanat, 25 mM Natriumcitrat pH 7,5 aufgenommen und nach dem folgenden Protokoll aufgereinigt. Zur Probe werden 150 µl 70% Ethanol zugegeben. Dann wird die Probe mittels Vakuum auf eine Silica-Membran enthaltende spin-Säule aufgetragen. Die spin-Säule wird zweimal mit einem Ethanol und NaCl haltigen Waschpuffer gewaschen, wobei der Waschpuffer ebenfalls mittels Vakuum durch die Membran geführt wird. Die spin-Säule wird mittels Vakuum für 10 min getrocknet. Dann wird die RNA zweimal mit je 60 µl Wasser eluiert, wobei die spin-Säule für je 1 min bei 10 000 x g zentrifugiert wird. Die Ergebnisse werden in Tabelle 11 zusammengefaßt.

Tabelle 11

Ausbeute an HeLa-RNA im Eluat in Abhängigkeit von der Konzentration der eingesetzten Substanz. Zur Bestimmung der Ausbeute wird der Berechnungsfaktor für RNA herangezogen (1 OD _{260nm} = 40 µg/ml).			
	Substanz	Konzentration in % (w/v)	Ausbeute/ µg
40	Ethandiyl-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid)	1	22,2
		9	25,0
		15	19,5
45	Ethandiyl-1,2-bis(dimethyldecylammoniumthiosulfat)	1	24,5
		9	25
		15	24
50	Ethandiyl-1,2-bis(dimethyldecylammoniumsulfat)	1	22,2
		9	25
		15	22,4
55	Ethandiyl-1,2-bis(dimethyldecylammoniumjodid)	1	18,9
		9	23
		15	19,2

Tabelle 11 (fortgesetzt)

Ausbeute an HeLa-RNA im Eluat in Abhängigkeit von der Konzentration der eingesetzten Substanz. Zur Bestimmung der Ausbeute wird der Berechnungsfaktor für RNA herangezogen (1 OD _{260nm} = 40 µg/ml).			
	Substanz	Konzentration in % (w/v)	Ausbeute/ µg
5	N,N',N"-tridecyl-N,N,N',N",N"-pentamethyl-bis-(2-ammonioethyl)ammoniumbromid	1	15,3
		9	12,7
		13	23,2
10	N,N',N"-tritetradearyl-N,N,N',N",N"-pentamethyl-bis-(2-ammonioethyl)ammoniumbromid	1	11,3
		9	9,9
		15	6,3
15	EthandiyI-1,2-bis(dimethyloctylammoniumbromid)	3	7,6
		15	6,5
20	Propandiyl-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid)	3	21,2
		8	24,6
		13	24,7
25	Butandiyl-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid)	1	24,6
		9	25
		13	11,3
30	EthandiyI-1,2-bis(dimethyldodecylammoniumbromid)	1	14,4
		8	14,5
		15	7,3
35	Propandiyl-1,2-bis(dimethyltetradecylammoniumbromid)	1	13,8
		9	18
		15	14,6
40	Hexadimethrin Bromid	1	9,6
		5	3

[0106] Das Ergebnis zeigt, daß alle Substanzen zur Komplexierung von RNA verwendet werden können. Einige Substanzen wirken aber unter den gewählten Bedingungen deutlich effektiver als andere.

Beispiel 14: Stabilisierung von RNA mittels kationischer Verbindungen in Blut

[0107] Zu 1 ml Blut wird 1 ml Stabilisierungspuffer, bestehend aus 2 % (w/v) EthandiyI-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 50 mM Kaliumacetat pH 5,5 und 50 mM Tris HCl pH 7,0 gegeben. Der Ansatz wird gut gemischt und für 24 Stunden bzw. 96 Stunden bei Raumtemperatur oder bei 4°C gelagert. Die Komplexe bestehend aus Nukleinsäure und kationischer Verbindung werden für 3 min bei 4000 x g zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet in 1 ml eines Puffers bestehend aus 6 M Guanidinhydrochlorid, 50 mM Tris HCl pH 7,0, 1 % (v/v) Nonidet P40 rückgelöst. Dann werden 800 µg Proteinase K zugegeben und der Ansatz für 1 Stunde bei 60°C inkubiert. Dann wird 1 ml 80 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Nonidet P40 zugegeben und die Probe mittels Vakuum auf eine Silica-Membran enthaltende spin-Säule aufgetragen. Die spin-Säule wird mit 350 µl eines Guanidiniumthiocyanat und Ethanol-haltigen Puffers gewaschen. Dann werden 80 µl eines Tris HCl-Puffers mit MgCl₂, der 75 U DNase I (Pharmacia) enthält, auf die Silica-Membran pipettiert und zum Abbau der genomischen DNA für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die spin-Säule wird nochmals mit 350 µl des Guanidiniumthiocyanat und Ethanol-haltigen Puffers gewaschen und im Anschluß mit 700 µl eines Ethanol-haltigen Waschpuffers. Die spin-Säule wird für 3 min bei 20 000 x g trockenentrifugiert und die RNA in zwei Schritten mit je 30 µl Wasser eluiert.

[0108] Jeweils 3 µl des Eluates werden für einen RT-PCR Nachweis der β-Actin mRNA in einem ABI PRISM 7700

Sequence Detector (Applied Biosystems) (sog. TaqMan Technologie) eingesetzt.

- [0109] Die TaqMan Technologie nutzt Oligonukleotid-Sonden, die einen Reporter- und einen Quencher-Farbstoff enthalten. Während der PCR-Amplifikation wird die 5'-3' Exonuklease Aktivität der Taq-Polymerase genutzt um den Reporter-Farbstoff vom Quencher-Farbstoff zu trennen, wodurch ein Sequenz-spezifisches Fluoreszenz-Signal generiert wird, das mit jedem Amplifikationszyklus ansteigt. Die Quantifizierung basiert auf dem threshold cycle, bei dem ein vorher definierter Grenzwert der Fluoreszenz erreicht wird. Der Vergleich der threshold cycles liefert ein Maß für die relative Konzentration an template in verschiedenen Proben. Die Messung während der logarithmischen Phase, wenn die PCR Genauigkeit am höchsten ist, liefert präzise Daten für eine genaue Bestimmung.
- [0110] Das Ergebnis ist in Tabelle 12 dargestellt.

10

Tabelle 12

Analyse der β-Actin mRNA mittels TaqMan™ RT-PCR. Dargestellt sind die threshold cycles (C_T) der TaqMan™ Auswertung in Abhängigkeit von der Lagerung der stabilisierten Probe. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen von jeder Probe im ABI PRISM 7700 Sequence Detector durchgeführt.	
Lagerung	C_T
24 h 4°C	17,23
96 h 4°C	18,51
	18,30
	18,29
24 h Raumtemperatur	17,93
	17,89
96 h Raumtemperatur	19,34
	19,35

30

Beispiel 15: Stabilisierung von RNA mittels kationischer Verbindungen in Plasma

- [0111] In einem 2 ml Reaktionsgefäß werden zu 500 µl Plasma 500 µl enthaltend 2 % (w/v) Ethandiy-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 200 mM Natriumcitrat pH 3,0 zugegeben. In den Deckel des Reaktionsgefäßes werden 15 µg HeLa-RNA pipettiert, der Deckel geschlossen und der Ansatz gemischt. Jeweils eine Probe wird für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach sofort weiterverarbeitet. Die anderen Proben werden für 24 und 48 Stunden bei 4°C gelagert und dann die RNA isoliert. Zur Kontrolle wird die HeLa-RNA direkt ins Plasma pipettiert und nach 10 Sekunden werden 500 µl 2 % (w/v) Ethandiy-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 200 mM Natriumcitrat pH 3,0 zugegeben und weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Probenvorbereitung durchgeführt wird, bzw. die Kontrollen werden zusammen mit den stabilisierten Proben für 24 und 48 Stunden bei 4°C gelagert. Zur Probenvorbereitung werden dann 500 µl 2 % (w/v) Ethandiy-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), 200 mM Natriumcitrat pH 3,0 zugegeben, der Ansatz für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann weiterverarbeitet.

- [0112] Die Komplexe bestehend aus RNA und kationischer Verbindung werden für 3 min bei ca. 1100 x g abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 600 µl eines Puffers bestehend aus 6 M Guanidinhydrochlorid, 50 mM Tris HCl pH 7,0, 1 % (v/v) Nonidet P40 rückgelöst. Dann werden 800 µg Proteinase K zugegeben und der Ansatz für 30 min bei 40°C inkubiert. Dann wird 600 µl 80 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Nonidet P40 zugegeben und die Probe auf eine Silica-Membran enthaltende spin-Säule aufgetragen, wobei sie mittels Zentrifugation bei 3700 x g für 1 min durch die Membran geführt wird.

- [0113] Die spin-Säule wird mit 350 µl eines Guanidiniumthiocyanat und Ethanol haltigen Puffers gewaschen. Dann werden 80 µl eines Tris HCl-Puffers mit MgCl₂, der 75 U DNase I (Pharmacia) enthält auf die Silica-Membran pipettiert und zum Abbau der genomischen DNA für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die spin-Säule wird nochmals mit 350 µl des Guanidiniumthiocyanat und Ethanol haltigen Puffers gewaschen und im Anschluß zweimal mit je 500 µl eines Ethanol haltigen Waschpuffers. Die spin-Säule wird für 3 min bei 20 000 x g trockenentrifugiert und die RNA in zwei Schritten mit je 50 µl Wasser eluiert. Jeweils 4 µl des Eluates werden für einen RT-PCR Nachweis der β-Actin mRNA in einem ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems) eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen für den RT-PCR Nachweis sind identisch mit den in Beispiel 12 beschriebenen. Jeweils 30 µl des Eluates werden in einem 1,2 %igen Agarose/Formaldehyd/MOPS-Gel aufgetrennt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 und Abbildung 1 dargestellt.

Tabelle 13

Analyse der β -Aktin mRNA mittels TaqMan™ RT-PCR. Dargestellt sind die threshold cycles (C _t) der TaqMan™ Auswertung in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer der stabilisierten Proben und der Kontrollen. Es werden jeweils Doppelbestimmungen von jeder Probe im ABI PRISM 7700 Sequence Detector durchgeführt.			
	Lagerung	stab. Probe	Kontrolle
5	10 min RT*	15,90	21,49
		16,17	22,16
10	24 h 4°C	16,25	40**
		15,82	40**
15	48 h 4°C	16,43	40**
		16,49	40**

* Bei der Kontrolle wird die RNA für ca. 10 Sekunden ungeschützt im Plasma inkubiert, bevor der Stabilisierungspuffer zugegeben wird und für weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert wird.

** Es erfolgt innerhalb der 40 Zyklen keine Amplifikation von β -Aktin mRNA.

- [0114] In den Beispielen 14 und 15 wurde die mRNA des β -Aktin Gens mittels Amplifikation in einem ABI PRISM 7700 Sequence Detector nachgewiesen.
- [0115] Die β -Aktin mRNA wurde in einer Ein-Gefäß TaqMan RT-PCR amplifiziert. Für den 25 μ l Reaktionsansatz wurden Standardreagenzien in Kitformat der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems, (TaqMan PCR Reagent Kit, β -Aktin Detection Kit, AmpliTaq Gold DNA Polymerase, MuLV Reverse Transkriptase) sowie der Firma Promega (RNasin) eingesetzt. Die cDNA wurde für 60 min. bei 37°C synthetisiert, die AmpliTaq Gold DNA Polymerase anschließend für 12 min. bei 95°C aktiviert. Das spezifische β -Actin Fragment wurde mittels sich direkt anschließender PCR amplifiziert. Dafür wurden 40 PCR-Zyklen durchgeführt mit jeweils 15 sec 95°C und 1 min 60°C.
- [0116] Im Beispiel 15 bedeutet der Anstieg des C_T-Wertes (Threshold Cycle Wert) der Kontrollprobe "10 min. RT", zu der erst nach 10 sec der Stabilisierungspuffer gegeben wurde, von ca. 16 auf ca. 22, daß während der 10 Sekunden, in denen die RNA ungeschützt im Plasma vorlag, mehr als 99% der RNA abgebaut wurde (Kontrolle 10 min. RT). Dabei wurde davon ausgegangen, daß eine Differenz von 1 Threshold Cycle (1 C_T) einen ca. 2-fachen Unterschied der β -Aktin-mRNA Mengen in den zu analysierenden Proben bedeutet. Dieses Ergebnis wird durch die Gelanalyse bestätigt, die bei der Kontrolle nur noch einen sehr schwachen Schmier sehr stark abgebauter RNA zeigt (Abbildung 1, Spuren 4 und 5, 10 min. Raumtemperatur). Nach einer längeren Lagerung von 24 h bzw. 48 h ohne Zugabe von Stabilisierungspuffer ist die RNA in den Kontrollen komplett abgebaut (Kontrolle 24 h, 4°C und Kontrolle 48 h, 4°C). Es ist keine RNA mehr nachweisbar, weder in einer Agarose/Formaldehyd-Gelelektrophorese (Abb. 1, Spuren 4 und 5) noch in einer β -Aktin TaqMan RT-PCR (Kontrollen). Dabei bedeutet ein Threshold von 40, daß während der 40 PCR-Zyklen kein Amplifikationssignal erzeugt wurde und somit keine β -Aktin-mRNA mehr nachgewiesen werden konnte.
- [0117] Demgegenüber zeigen sowohl die Ergebnisse der β -Aktin-mRNA Amplifikation, als auch die Ergebnisse der Gelanalyse (Abb. 1), daß bei den gelagerten Proben, zu denen Stabilisierungspuffer gegeben wurde, kein Abbau der RNA stattgefunden hat (stab. Proben 10 min. RT, 24 h 4°C, 48 h 4°C). Dies ist an den deutlich erkennbaren Banden der ribosomalen RNA im Gel als auch an den im Rahmen der Genauigkeit der Methode als unverändert zu bezeichnenden C_T-Werten der TaqMan RT-PCR zu erkennen.
- [0118] Dieses Ergebnis wird auch im Beispiel 14 bestätigt, wo in den Blutproben selbst nach Lagerung für 96 h bei Raumtemperatur noch ein sehr sensitiver Nachweis der β -Aktin mRNA mittels der TaqMan™ RT-PCR möglich ist.
- [0119] Es wurde sowohl für Plasma als auch für Blut gezeigt, daß RNA in diesen biologischen Proben durch den Einsatz kationischer Verbindungen vor einem Abbau geschützt werden kann. Ungeschützte RNA wird hingegen in beiden Probenmaterialien innerhalb von wenigen Sekunden vollständig abgebaut.

Beispiel 16: Isolierung von HeLa-RNA aus Plasma mittels EthandiyI-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), gepuffert mit Zitronensäure im pH Bereich von pH 3-7

- [0120] 15 μ g HeLa-RNA werden in 500 μ l Plasma, gemischt mit 500 μ l eines Puffers, enthaltend 2 % (w/v) EthandiyI-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid) und 0,5 M Zitronensäure, unterschiedlicher pH-Werte (pH 3-7) pipettiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Isolierung der RNA werden die Komplexe bestehend aus kationischer Verbindung und Nukleinsäure für 3 min bei 1100 x g abzentrifugiert und in 600 μ l eines Puffers enthaltend 6 M

EP 1 031 626 A1

Guanidinhydrochlorid, 1 % (v/v) Nonidet-P40 und 50 mM Tris HCL pH 7,0 aufgenommen. Dann werden 800 µg Proteinase K zugegeben und der Ansatz für 30 min bei 40°C inkubiert, mit 600 µl einer Lösung enthaltend 80 % (v/v) Ethanol und 10 % (v/v) Nonidet-P40 versetzt und anschließend auf eine Silica-Membran enthaltende spin-Säule aufgetragen. Die Probe wird mittels Zentrifugation durch die Membran geführt. Die spin-Säule wird einmal mit einem Guanidinthiocyanat- und Ethanol-haltigen Waschpuffer gewaschen und zweimal mit einem NaCl- und Ethanol-haltigen Waschpuffer. Die spin-Säule wird für 3 min bei 20000 x g trockenzentrifugiert. Die RNA wird anschließend in 100 µl RNase-freiem Wasser, das ebenfalls mittels Zentrifugation durch die Membran geführt wird, eluiert. Jeweils 30 µl des Eluates werden auf einem 1,2 %igen Agarose/Formaldehyd Gel aufgetrennt.

[0121] Zur Kontrolle (K) wird die HeLa RNA direkt in das Plasma pipettiert und nach 10 Sekunden werden 500 µl eines Puffers, der neben 2 % (w/v) Ethandiy-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid) noch 0,5 M Zitronensäure pH 3,0 enthält, zugegeben und für weitere 10 min inkubiert. Danach wird die RNA isoliert wie oben beschrieben.

[0122] Abbildung 2 zeigt ein Agarosegel der oben beschriebenen Reaktionsansätze. Die Zahlen über den Spuren geben die jeweiligen pH-Werte an und K steht für Kontrollversuch.

[0123] Der Versuch zeigt klar, daß über den gesamten pH-Bereich intakte RNA mit gleicher Effizienz isoliert werden kann. Demgegenüber zeigt die Kontrolle, daß ungeschützte RNA im Plasma binnen Sekunden abgebaut wird.

Beispiel 17: Stabilisierung von HeLa-RNA in Plasma mittels Ethandiy-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid), gepuffert mit Zitronensäure im pH-Bereich von 3-5

[0124] 15 µg HeLa-RNA werden in 500 µl Plasma, stabilisiert mit 500 µl eines Puffers, enthaltend 2 % (w/v) Ethandiy-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid) und 0,5 M Zitronensäure, unterschiedlicher pH-Werte (pH 3-5 für 10 Minuten bei Raumtemperatur, bzw. für 24 und 48 Stunden bei 4°C gelagert. Zur Isolierung der RNA werden die Komplexe bestehend aus kationischer Verbindung und Nukleinsäure für 3 min bei 1100 x g abzentrifugiert und in 600 µl eines Puffers enthaltend 6 M Guanidinhydrochlorid, 1 % (v/v) Nonidet-P40 und 50 mM Tris HCL pH 7,0 aufgenommen. Dann werden 800 µg Proteinase K zugegeben und der Ansatz für 30 min bei 40°C inkubiert, mit 600 µl einer Lösung enthaltend 80 % (v/v) Ethanol und 10 % (v/v) Nonidet-P40 versetzt und anschließend auf eine Silica-Membran enthaltende spin-Säule aufgetragen. Die Probe wird mittels Zentrifugation durch die Membran geführt. Die spin-Säule wird einmal mit einem Guanidinthiocyanat- und Ethanol-haltigen Waschpuffer gewaschen und zweimal mit einem NaCl- und Ethanol-haltigen Waschpuffer. Die spin-Säule wird für 3 min bei 20000 x g trockenzentrifugiert. Die RNA wird anschließend in 100 µl RNase-freiem Wasser, das ebenfalls mittels Zentrifugation durch die Membran geführt wird, eluiert. Jeweils 30 µl des Eluates werden auf einem 1,2 %igen Agarose/Formaldehyd Gel aufgetrennt (Abb.3).

[0125] Zur Kontrolle (K) wird die HeLa RNA direkt in das Plasma pipettiert und nach 10 Sekunden werden 500 µl eines Puffers, der neben 2 % (w/v) Ethandiy-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid) noch 0,5 M Zitronensäure pH 3,0 enthält, zugegeben und für weitere 10 min inkubiert. Danach wird die RNA isoliert wie oben beschrieben.

[0126] Abbildung 3 zeigt ein Agarosegel der Reaktionsansätze bei einer Stabilisierung von 10 Minuten bei Raumtemperatur, bzw. von 24 und 48 Stunden bei 4°C. Die Zahlen über den Spuren geben die jeweiligen pH-Werte an und K steht für Kontrollversuch.

[0127] Der Versuch zeigt, daß durch den Puffer, enthaltend Ethandiy-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid) und Zitronensäure, RNA in Plasma auch über einen langen Zeitraum stabil bleibt.

Beispiel 18: Isolierung von HeLa-RNA aus Plasma mittels kationischer Verbindungen mit zwei Stickstoff- oder Phosphor-Zentren, verknüpft über eine Brücke bestehend aus einer aromatischen Verbindung oder Ethan

[0128] 5 µg HeLa-RNA werden in 500 µl Plasma, gemischt mit 500 µl einer Lösung der kationischen Verbindung A, B, C, D oder E (siehe unten), pipettiert und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur gelagert. Zur Isolierung der RNA werden die Komplexe bestehend aus kationischer Verbindung und Nukleinsäure für 3 min bei 1530 x g abzentrifugiert und in 300 µl eines Puffers enthaltend 6 M Guanidinhydrochlorid, 1 % (v/v) Nonidet-P40 und 50 mM Tris HCL pH 7,0 aufgenommen. Dann werden 400 µg Proteinase K zugegeben und der Ansatz für 10 min bei 40°C inkubiert, mit 300 µl einer Lösung enthaltend 80 % (v/v) Ethanol und 10 % (v/v) Nonidet-P40 versetzt und anschließend auf eine Silica-Membran enthaltende spin-Säule aufgetragen. Die Probe wird mittels Zentrifugation durch die Membran geführt. Die spin-Säule wird einmal mit einem Guanidinthiocyanat- und Ethanol-haltigen Waschpuffer gewaschen und zweimal mit einem NaCl- und Ethanol-haltigen Waschpuffer. Die spin-Säule wird für 3 min bei 20000 x g trockenzentrifugiert. Die RNA wird anschließend in 80 µl RNase-freiem Wasser, das ebenfalls mittels Zentrifugation durch die Membran geführt wird, eluiert. Jeweils 25 µl des Eluates werden auf einem 1,2 %igen Agarose/Formaldehyd Gel aufgetrennt (Abb. 4).

[0129] Abbildung 4 zeigt 5 Agarosegele der o.g. Reaktionsansätze. Die Buchstaben und Zahlen über den Gelen geben die Konzentration der jeweiligen kationischen Verbindungen A bis E an, wobei:

A: o-Xylylen-bis-decyldimethylammonium bromid

- B: m-Xylylene-bis-decyldimethylammonium bromid
 C: p-Xylylen-bis-decyldimethylammonium bromid
 D: [1,8]-dimethylnaphthaleno, alpha, alpha'-bis-dimethyldecylammonium bromid und
 E: EthandiyI-1,2-bis(decyldimethylphosphonium bromid)

5 ist. Der Versuch zeigt, daß die o.g. kationischen Verbindungen zur Isolierung von RNA aus Plasma geeignet sind. Die Ausbeuten liegen zwischen 63 % (=3,2 µg) und 74 % (3,7 µg) der eingesetzten RNA.

10 Beispiel 19: Isolierung von RNA und genomicscher DNA aus 1×10^6 HeLa Zellen mittels kationischer Verbindungen mit zwei Stickstoff- oder Phosphor-Zentren, verknüpft über eine Brücke bestehend aus einer aromatischen Verbindung oder Ethan

[0130] 1×10^6 HeLa Zellen, gelöst in 500 µl PBS-Puffer, werden mit 500 µl einer Lösung der kationischen Verbindung A,B,C,D oder E (siehe unten) gemischt und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur gelagert. Zur Isolierung der RNA werden die Komplexe bestehend aus kationischer Verbindung und Nukleinsäure für 3 min bei $1530 \times g$ abzentrifugiert und in 300 µl eines Puffers enthaltend 6 M Guanidinhydrochlorid, 1 % (v/v) Nonidet-P40 und 50 mM Tris HCl pH 7,0 aufgenommen. Dann werden 400 µg Proteinase K zugegeben und der Ansatz für 10 min bei 40°C inkubiert, mit 300 µl einer Lösung enthaltend 80 % (v/v) Ethanol und 10 % (v/v) Nonidet-P40 versetzt und anschließend auf eine Silica-Membran enthaltende spin-Säule aufgetragen. Die Probe wird mittels Zentrifugation durch die Membran geführt.
 20 Die spin-Säule wird einmal mit einem Guanidinthiocyanat- und Ethanol-haltigen Waschpuffer gewaschen und zweimal mit einem NaCl- und Ethanol-haltigen Waschpuffer. Die spin-Säule wird für 3 min bei $20000 \times g$ trockenzentrifugiert. Die RNA wird anschließend in 80 µl RNase-freiem Wasser, das ebenfalls mittels Zentrifugation durch die Membran geführt wird, eluiert. Jeweils 25 µl des Eluates werden auf einem 1,2 %igen Agarose/Formaldehyd Gel aufgetrennt (Abb. 5).
 [0131] Abbildung 5 zeigt 5 Agarosegele der o.g. Reaktionsansätze. Die Buchstaben und Zahlen über den Gelen
 25 geben die Konzentration der jeweiligen Kationischen Verbindungen A bis E an, wobei:

- A: o-Xylylen-bis-decyldimethylammonium bromid
 B: m-Xylylen-bis-decyldimethylammonium bromid
 C: p-Xylylen-bis-decyldimethylammonium bromid
 30 D: [1,8]-dimethylnaphthaleno, alpha, alpha'-bis-dimethyldecylammonium bromid und
 E: EthandiyI-1,2-bis(decyldimethylphosphonium bromid)

ist.

35 Beispiel 20: Isolierung genomicscher DNA aus Blut mittels kationischer Verbindungen mit zwei Stickstoff- oder Phosphor-Zentren, verknüpft über eine Brücke bestehend aus einer aromatischen Verbindung oder Ethan

[0132] 0,5 ml Blut werden mit 0,5 ml der kationischen Verbindung A,B,C,D oder E (siehe unten) gemischt und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur gelagert. Zur Isolierung der DNA werden die Komplexe aus kationischer Verbindung und DNA für 3 min bei $1530 \times g$ abzentrifugiert. Das Pellet wird in 360 µl eines NaCl- und EDTA-haltigen Puffers aufgenommen, dann werden 400 µl Puffer AL (QIAGEN GmbH; Cat. No.: 19075) sowie 20 µl Proteinase K (18 mg/ml) zugegeben. Die Proben werden für 10 min bei 65°C inkubiert, dann werden 420 µl Ethanol zugegeben und die Probe auf eine Silica-Membran enthaltende spin-Säule aufgetragen. Die Probe wird mittels Zentrifugation durch die Membran geführt. Die Silica-Membran wird je einmal mit Puffer AW 1 (QIAGEN GmbH, Cat. No.: 19081) und einmal mit Puffer AW 2 (QIAGEN GmbH, Cat. No.: 19072) gewaschen. Die DNA wird mit 100 µl Wasser eluiert. Je 25 µl des Eluates werden auf einem 0,8 %igen Agarose/TBE Gel aufgetrennt (Abb. 6).

[0133] Abbildung 6 zeigt 5 Agarosegele der o.g. Reaktionsansätze. Die Buchstaben und Zahlen über den Gelen
 45 geben die Konzentration der jeweiligen Kationischen Verbindungen A bis E an, wobei:

- 50 A: o-Xylylen-bis-decyldimethylammonium bromid
 B: m-Xylylen-bis-decyldimethylammonium bromid
 C: p-Xylylen-bis-decyldimethylammonium bromid
 D: [1,8]-dimethylnaphthaleno, alpha, alpha'-bis-dimethyldecylammonium bromid und
 E: EthandiyI-1,2-bis(decyldimethylphosphonium bromid)

55 ist. Die Ausbeuten an genomicscher DNA aus 0,5 ml Blut liegen zwischen 6 µg und 11 µg.

Beispiel 21: Stabilisierung von RNA in Plasma mittels kationischer Verbindungen mit zwei Stickstoff- oder Phosphor-Zentren, verknüpft über eine Brücke bestehend aus einer aromatischen Verbindung oder Ethan, gepuffert mit einem Weinsäurepuffer im pH Bereich 4-5

- 5 [0134] 6 µg HeLa-RNA werden in 500 µl Plasma, stabilisiert mit 500 µl eines Puffers, enthaltend die kationische Verbindung A, B, D oder E in einer Konzentration von 4 oder 5 % (w/v) und 0,25 M Weinsäure pH 4 für 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Zur Isolierung der RNA werden die Komplexe bestehend aus kationischer Verbindung und Nukleinsäure- für 3 min bei 1530 x g abzentrifugiert und in 300 µl eines Puffers enthaltend 6 M Guanidinhydrochlorid, 1 % (v/v) Nonidet-P40 und 50 mM Tris HCL pH 7,0 aufgenommen. Dann werden 400 µg Proteinase K zugegeben und Nonidet-P40 versetzt und anschließend auf eine Silica-Membran enthaltende spin-Säule aufgetragen. Die Probe wird nol-haltigen Waschpuffer gewaschen und zweimal mit einem NaCl- und Ethanol-haltigen Waschpuffer. Die spin-Säule wird für 3 min bei 20000 x g trockenentrifugiert. Die RNA wird anschließend in 80 µl RNase-freiem Wasser, das eben- %igen Agarose/Formaldehyd-Gel aufgetrennt (Abb. 7).
- 10 [0135] Zur Kontrolle (K) wird die HeLa RNA direkt in das Plasma pipettiert und nach 10 Sekunden werden 500 µl eines Puffers, der neben 2 % (w/v) Ethandiy-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid) noch 0,25 M Weinsäure pH 4 enthält, zugegeben und für weitere 10 min inkubiert. Danach wird die RNA isoliert wie oben beschrieben.
- 15 [0136] Abbildung 7 zeigt 5 Agarosegele der o.g. Reaktionsansätze. Die Buchstaben und Zahlen über den Gelen geben die Konzentration der jeweiligen Kationischen Verbindungen A bis E an, wobei:

- A: o-Xylylen-bis-decyldimethylammonium bromid
 B: m-Xylylen-bis-decyldimethylammonium bromid
 25 D: [1,8]-dimethylnaphthaleno, alpha, alpha'-bis-dimethyldecylammonium bromid
 E: Ethandiy-1,2-bis(decyldimethylphosphonium bromid) und
 K: Kontrolle

ist.

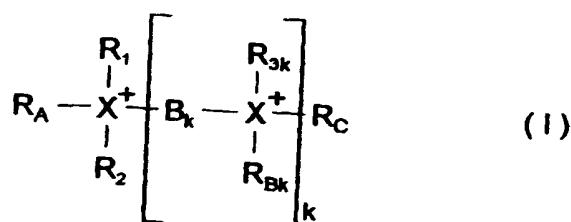
30

Patentansprüche

1. Verfahren zur Stabilisierung und/oder Isolierung von Nukleinsäuren aus einer biologischen Probe, umfassend den folgenden Schritt:

35

in Kontaktbringen der biologischen Probe mit mindestens einer kationischen Verbindung der Formel (I)

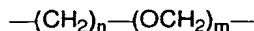


50 wobei als Anion (A) konjugierte Basen von starken und/oder schwachen anorganischen und/oder organischen Säuren verwendet werden, wobei die Substanz bestehend aus kationischer Verbindung (I) und Anion insgesamt ladungsneutral ist,

- 55 X Stickstoff (N) oder Phosphor (P) bedeutet,
 k die ganze Zahl 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 oder 24

EP 1 031 626 A1

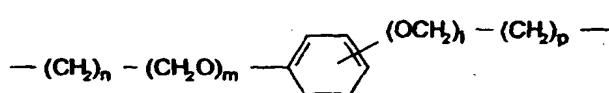
5 B_k bezeichnet aliphatische Alkandiylenbrücken, die an keinem, an einem oder an mehreren Kohlenstoff-Atomen substituiert sein können und in denen ein oder mehrere nicht benachbarte Kohlenstoff-Atome durch Sauerstoff ersetzt sein können, der Struktur



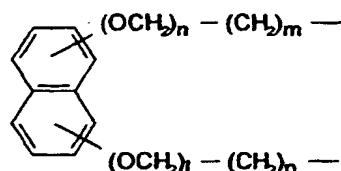
wobei n, m unabhängig voneinander die ganze Zahl 0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6 bedeutet und $n + m > 0$ ist,

15 alternativ bedeutet

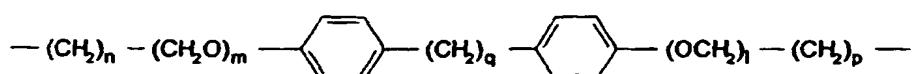
10 B_k eine substituierte Phenyl-, Naphthyl- oder Biphenyl-Brücke, die zusätzlich an einem oder an mehreren Kohlenstoff-Atomen substituiert sein kann, der Struktur



20 oder



30 oder



wobei n, m, l, p, q unabhängig voneinander die ganze Zahl 0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6 bedeutet,

40 R_1, R_2, R_{3k} , die identisch oder unterschiedlich voneinander sein können und die unsubstituiert oder an einem oder mehreren Kohlenstoff-Atomen substituiert sein können, bedeuten Wasserstoff, ein lineares oder verzweigtes C₁-C₆-Alkyl, ein lineares oder verzweigtes C₁-C₆-Alkenyl, ein lineares oder verzweigtes C₁-C₆-Alkinyl, ein Phenyl, ein Benzyl, ein Phenoxyethyl der Struktur



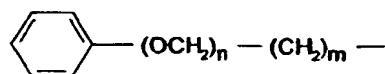
50

wobei n, m unabhängig voneinander die ganze Zahl 0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6 bedeutet und

55 Z eine der Strukturen -O-, -CO-, -CO₂-, -OCO-, -CO-N-, -N-CO-, -O-CO-N-, -N-CO-O-, -S- oder -S-S- bezeichnet,

oder R_1, R_2, R_{3k} bedeuten ein Phenyl, ein Benzyl, ein Phenoxyethyl der Struktur

5



10

wobei n, m unabhängig voneinander die ganze Zahl 0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6 bedeutet,

15

R_A , R_{Bk} , R_C , die identisch oder unterschiedlich voneinander sein können und die unsubstituiert oder an einem oder mehreren Kohlenstoff-Atomen substituiert sein können, bedeuten Wasserstoff, ein lineares oder verzweigtes C₁-C₂₁-Alkyl, ein lineares oder verzweigtes C₁-C₂₁-Alkenyl, ein lineares oder verzweigtes C₁-C₂₁-Alkinyl, oder eine Struktur

20

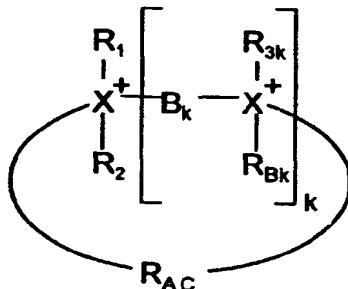
wobei n, m unabhängig voneinander die ganze Zahl 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 oder 24 bedeutet und

25

Z eine der Strukturen -O-, -CO-, -CO₂-, -OCO-, -CO-N-, -N-CO-, -O-CO-N-, -N-CO-O-, -S- oder -S-S- bezeichnet,

alternativ bilden R_A und R_C zusammen einen Rest R_{AC} und somit eine cyclische Struktur

30



35

40

wobei der Rest R_{AC} , der unsubstituiert oder an einem oder mehreren Kohlenstoff-Atomen substituiert sein kann, ein lineares oder verzweigtes C₁-C₈-Alkyl, ein lineares oder verzweigtes C₁-C₈-Alkenyl, oder ein lineares oder verzweigtes C₁-C₈-Alkinyl bedeutet,
und wobei für $k > 1$ die Brückengruppen B_k sowie die Gruppen R_{Bk} und R_{3k} gleich oder verschieden voneinander sein können.

45

50

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei Verbindungen der allgemeinen Formel (I) verwendet werden mit einem Anion A ausgewählt aus der Gruppe: Fluorid, Chlorid, Bromid, Jodid, Perchlorat, Perbromat, Periodat, Phosphat, Hydrogenphosphat, Dihydrogenphosphat, Sulfat, Thiosulfat, Hydroxid, Carbonsäuren, α -Halogen-Carbonsäuren und/oder Hydroxy-Carbonsäuren
und wobei

k bedeutet die ganze Zahl 1, 2, 3, 4, 5 oder 6,

55

wobei für den Fall, daß B_k eine substituierte Phenyl-, Naphthyl- oder Biphenyl-Brücke bezeichnet, n, m, l, p, q unabhängig voneinander die ganze Zahl 0, 1 oder 2 bedeutet.

R_1 , R_2 , R_{3k} , die identisch oder unterschiedlich voneinander sein können, bedeuten

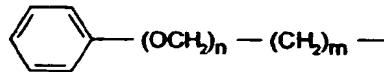
EP 1 031 626 A1

5 die C₁-C₆-Alkyl-Gruppen methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, 1-methylpropyl, 2-methylpropyl, 1,1-dimethylethyl, n-pentyl, 1-methylbutyl, 2-methylbutyl, 3-methylbutyl, 1,1-dimethylpropyl, 1,2-dimethylpropyl, 2,2-dimethylpropyl, 1-ethylpropyl, hexyl, 1-methylpentyl, 2-methylpentyl, 3-methylpentyl, 4-methylpentyl, 1,1-dimethylbutyl, 1,2-dimethylbutyl, 1,3-dimethylbutyl, 2,2-dimethylbutyl, 2,3-dimethylbutyl, 3,3-dimethylbutyl, 1-ethylbutyl, 2-ethylbutyl, 1,1,2-trimethylpropyl, 1,2,2-trimethylpropyl, 1-ethyl-1-methylpropyl und/oder 1-ethyl-2-methyl-propyl,

10 und/oder die C₃-C₆-Alkenyl-Gruppen 2-propenyl (allyl), 2-butenyl, 3-butenyl, 1-methyl-2-propenyl, 2-methyl-2-propenyl, 2-pentyl, 3-pentyl, 4-pentyl, 1-methyl-2-butenyl, 2-methyl-3-butenyl, 3-methyl-3-butenyl, 1,1-dimethyl-2-propenyl, 1,2-dimethyl-2-propenyl, 1-ethyl-2-propenyl, 2-hexenyl, 3-hexenyl, 4-hexenyl, 5-hexenyl, methyl-2-pentenyl, 2-methyl-2-pentenyl, 3-methyl-2-pentenyl, 4-methyl-2-pentenyl, 1-methyl-3-pentenyl, 2-methyl-3-pentenyl, 3-methyl-3-pentenyl, 4-methyl-3-pentenyl, 1-methyl-4-pentenyl, 3-methyl-4-pentenyl, 4-methyl-4-pentenyl, 1,1-dimethyl-2-butenyl, 1,1-dimethyl-2-butenyl, 1,1-dimethyl-3-butenyl, 1,2-dimethyl-2-butenyl, 1,2-dimethyl-3-butenyl, 1,3-dimethyl-2-butenyl, 1,3-dimethyl-3-butenyl, 2,2-dimethyl-3-butenyl, 2,3-dimethyl-2-ethyl-2-butenyl, 2-ethyl-3-butenyl, 1,1,2-trimethyl-2-propenyl, 1-ethyl-1-methyl-2-propenyl und/oder 1-ethyl-2-methyl-2-propenyl,

15 und/oder die C₃-C₆-Alkinyl-Gruppen 2-propinyl (propargyl), 2-butyinyl, 3-butyinyl, 2-pentinyl, 3-pentinyl, 4-pentinyl, 3-methyl-2-butyinyl, 2-hexinyl, 3-hexinyl, 4-hexinyl, 5-hexinyl, 3-methyl-2-pentinyl, 4-methyl-2-pentinyl, 2-methyl-3-pentinyl, 4-methyl-3-pentinyl, 1-methyl-4-pentinyl, 1,1-dimethyl-2-butyinyl, 1,1-dimethyl-2-butyinyl, 1,1-dimethyl-3-butyinyl, 1,2-dimethyl-3-butyinyl, 1,3-diinethyl-2-butyinyl, 2,2-dimethyl-3-butyinyl, 1-ethyl-2-butyinyl, 1-ethyl-3-butyinyl, 2-ethyl-3-butyinyl und/oder 1-ethyl-1-methyl-2-propinyl

20 und/oder die Gruppen Benzyl, Phenylethyl, Phenylpropyl, Phenylisopropyl Phenylisobutyl, Phenoxyethyl, Phenoxypropyl, Phenoxyisopropyl, Phenoxybutyl, Phenoxyisobutyl der Struktur



wobei n, m unabhängig voneinander die ganze Zahl 0, 1 oder 2 bedeutet
und

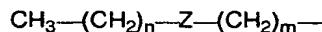
35 R_A, R_{Bk}, R_C, die identisch oder unterschiedlich voneinander sein können, bedeuten

die linearen oder verzweigten C₈-C₂₀-Alkyl-Gruppen octyl, decyl, undecyl, dodecyl, tridecyl, tetradecyl, pentadecyl, hexadecyl, heptadecyl, octadecyl, nonadecyl und/oder eicosyl

40 und/oder die linearen oder verzweigten C₈-C₂₀-Alkenyl-Gruppen octenyl, decenyl, undecenyl, dodecenyl, tridecenyl, tetradecenyl, pentadecenyl, hexadecenyl, heptadecenyl, octadecenyl, nonadecenyl und/oder eicosenyl

45 und/oder die linearen oder verzweigten C₈-C₂₀-Alkinyl-Gruppen octinyl, decinyl, undecinyl, dodecinyl, tridecinyl, tetradecinyl, pentadecinyl, hexadecinyl, heptadecinyl, octadecinyl, nonadecinyl und/oder eicosinyl

und/oder eine Struktur

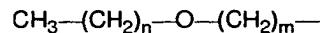


wobei n, m unabhängig voneinander sind und n die ganze Zahl 2, 3 oder 4 bedeutet und m die ganze Zahl 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 oder 18 bedeutet und

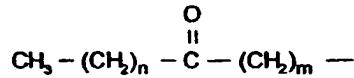
Z eine der Strukturen -O-, -CO-, -OCO-, -CO-N- oder -N-CO- bezeichnet.

- 55 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei eine oder mehrere der mit R_A, R_{Bk}, und R_C bezeichneten Gruppen die Struktur

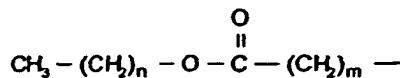
EP 1 031 626 A1



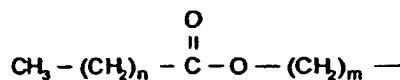
5



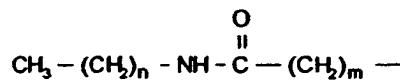
10



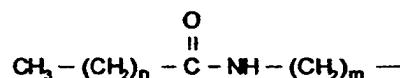
15



20



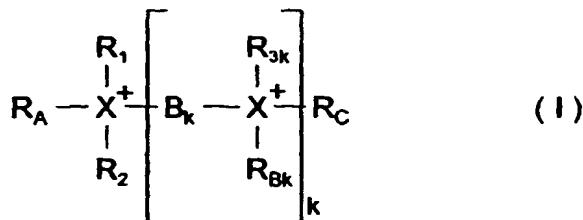
oder



25

bedeutet.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei R_1 , R_2 und/oder R_{3k} die Allyl-Gruppe bedeuten.
- 30 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei kationische Verbindungen der allgemeinen Formel (I) verwendet werden mit einem Anion A ausgewählt aus der Gruppe: Bromid, Jodid, Perchlorat, Hydrogenphosphat, Sulfat, Acetat, Trifluoroacetat, Trichloroacetat, Benzoat, Oxalat, Succinat, Phthalat, Citrat, Tartrat, Maleat, Malonat, Fumarat.
- 35 und wobei
 - k die ganze Zahl 1 oder 2 bedeutet,
 - 40 B_k bezeichnet die aliphatischen C_2-C_4 -Alkandiylbrücken Ethan-1,1-diyl, Ethan-1,2-diyl, Propan-1,1-diyl, Propan-1,2-diyl, Propan-1,3-diyl, Butan-1,1-diyl, Butan-1,2-diyl, Butan-1,3-diyl und/oder Butan-1,4-diyl,
 - 45 R_1 , R_2 , R_{3k} bedeuten methyl, ethyl oder hydroxyethyl,
 - 50 R_A , R_{Bk} , R_C bedeuten die linearen C_8-C_{20} -Alkyl-Gruppen octyl, decyl, undecyl, dodecyl, tridecyl, tetradecyl, pentadecyl, hexadecyl, heptadecyl, octadecyl, nonadecyl und/oder eicosyl.
 - 55 6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei R_1 , R_2 und R_{3k} identisch sind und/oder R_A , R_{Bk} und R_C identisch sind und/oder für $k > 1$ die Brückengruppen B_k identisch sind.
 - 7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Kohlenstoff-Atome der Gruppen R_1 , R_2 , R_{3k} , R_A , R_{Bk} und R_C mit einem oder mehreren Halogenatomen, insbesondere einem oder mehreren Fluor-Atomen, und/oder einer oder mehreren primären, sekundären und/oder tertiären Hydroxylgruppen und/oder einer oder mehreren $-SH$, $-NH_2$, $-NH-$ und/oder $=N-$ Gruppen substituiert sind, wobei die Substituenten untereinander identisch oder nicht identisch sein können.
 - 55 8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei ein oder mehrere der Kohlenstoff-Atome der Gruppen R_1 , R_2 , R_{3k} , R_A , R_{Bk} und R_C , die nicht direkt an eines der Stickstoff-Atome oder Phosphor-Atome der Verbindung



gebunden sind, substituiert sind.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die aliphatischen und/oder aromatischen Kohlenstoff-Atome der Brückgruppen B_k mit einem oder mehreren Halogenatomen, insbesondere Fluor-Atomen, und/oder einer oder mehreren primären, sekundären und/oder tertiären Hydroxylgruppen und/oder einer oder mehreren $-SH$, $-NH_2$, $-NH-$ und/oder $=N$ -Gruppen und/oder einer oder mehreren linearen oder verzweigten C_1-C_4 -Alkylgruppen substituiert sind, wobei die Substituenten untereinander identisch oder nicht identisch sein können.
- 15 10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei ein oder mehrere der aliphatischen und/oder aromatischen Kohlenstoff-Atome der Brückgruppen B_k mit einer oder mehreren Methyl-, Ethyl-, Propyl-, i-Propyl-, Butyl-, 2-Methylpropyl- und/oder tert.-Butyl-Gruppe substituiert sind.
- 20 11. Verfahren nach einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, wobei als kationische Verbindung Ethandiyi1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid) verwendet wird.
- 25 12. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 10, wobei als kationische Verbindung Propandiyl-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid) verwendet wird.
- 30 13. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 10, wobei als kationische Verbindung Ethandiyi1,2-bis(dimethyltetradecylammoniumbromid) verwendet wird.
- 35 14. Verfahren nach einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche 1 bis 10, wobei als kationische Verbindung N,N',N"-Tridecyl-N,N,N',N"-pentamethyl-bis-(2-ammonioethyl)ammoniumbromid verwendet wird.
15. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die mindestens eine kationische Verbindung der Probe in Form eines Feststoffs zugegeben wird.
- 40 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei die mindestens eine kationische Verbindung der Probe in Form einer Lösung zugegeben wird, wobei bevorzugt mindestens 0,001 Volumen, weiterhin bevorzugt mindestens 0,01 Volumen, besonders bevorzugt mindestens 0,05 Volumen und insbesondere 1 Volumen der Lösung der Probe zugegeben werden.
- 45 17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei die Lösung der mindestens einen kationischen Verbindung eine Konzentration von 0,01% bis Sättigung, bevorzugt 0,5 bis 5%, besonders bevorzugt 2 bis 4% aufweist.
18. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Verfahren weiterhin den folgenden Schritt aufweist:
- Vermischen der mindestens einen kationischen Verbindung mit der biologischen Probe.
- 50 19. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei zur direkten Isolierung von Nukleinsäuren nach dem Vermischen inkubiert, bevorzugt 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wird.
- 55 20. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei der mindestens einen kationischen Verbindung und/oder dem gebildeten Komplex aus Nukleinsäure und kationischer Verbindung(en) weitere Mittel zur Unterstützung der Lyse und/oder Mittel zur Homogenisierung und/oder Mittel zur mechanischen Einwirkung und/oder Mittel zur enzymatischen Einwirkung zugefügt werden.

EP 1 031 626 A1

21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei die Mittel zur Unterstützung der Lyse Alkohole, insbesondere verzweigte oder unverzweigte C1- bis C4-Alkanole, wie Isopropanol, Aldehyde, insbesondere niedere C1- bis C4-Aldehyde, verzweigt oder unverzweigt, wie z.B. Glycal, Phenole, Phenolderivate, ionische, zwitterionische und nichtionische Detergentien, Sulfhydryl reduzierende Reagenzien, insbesondere Dithiothreitol, Phosphorsäurederivate, insbesondere Tributylphosphat, chaotrophe Reagenzien wie Harnstoff, Carbonsäuren, wie z.B. Zitronensäure oder Malonsäure, oder einfache Salze, wie Ammoniumsalze oder Alkaliphosphate, sind, die einzeln oder in Kombination vorliegen können.
- 5
22. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die gebildeten Komplexe aus Nukleinsäure und kationischer Verbindung(en) durch Zentrifugation sedimentiert werden.
- 10
23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei die Zentrifugation bei niedrigen g-Zahlen, insbesondere 500 bis 5000 g, für 3 bis 10 Minuten durchgeführt wird.
- 15
24. Verfahren nach Anspruch 22 und/oder 23, wobei der Komplex in dem gebildeten Sediment in einem Puffer aufgelöst wird.
- 20
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 24, wobei die Komplexe aus Nukleinsäure und kationischer Verbindung(en) durch Vakuum, Überdruck, Zentrifugation oder Kapillarkräfte auf der Oberfläche einer Membran konzentriert werden.
- 25
26. Verfahren nach Anspruch 25, wobei die auf der Oberfläche einer Membran konzentrierten Komplexe zur Freisetzung der Nukleinsäuren aufgelöst und die freigesetzten Nukleinsäuren wiederum auf einer Membran, bevorzugt derselben Membran, gebunden werden.
- 30
27. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die biologische Probe eine Lebensmittelprobe ist, die freie oder gebundene Nukleinsäuren oder nukleinsäurehaltige Zellen enthält, eine Umweltprobe ist, die freie oder gebundene Nukleinsäuren oder nukleinsäurehaltige Zellen enthält, ein zellfreies Probenmaterial, eine Suspension von Zellen, Viren, Bakterien oder Hefen, ein Gewebe jeder Art oder eine klinische Probe, wie Blut, Plasma, Serum, Sperma, Sputum, Urin, Faeces, Leukozytentfraktionen, Crusta Phlogistica oder Abstriche, sowie eine Pflanze oder ein Pflanzenteil oder freie Nukleinsäuren sein kann.
- 35
28. Verfahren nach Anspruch 1, umfassend nach dem Schritt des Inkontaktbringens der biologischen Probe mit der (den) kationischen Verbindung(en) die folgenden weiteren Schritte:
- 40
- Zusatz geeigneter Mittel zur Unterstützung der Lyse und/oder zur enzymatischen Einwirkung und/oder mechanischen Einwirkung auf die zusammengeführte Probe/kationische Verbindung(en),
 - Mischen der erhaltenen Probe,
- 45
- Sammeln der Komplexe aus Nukleinsäure und kationischer Verbindung auf dem Boden eines Gefäßes oder an einer Membran durch Zentrifugation, Vakuum, Überdruck und/oder Kapillarkräfte,
 - gegebenenfalls Waschen der Komplexe mit einer geeigneten Waschlösung unter Einsatz von Zentrifugation, Überdruck, Vakuum und/oder Kapillarkräften,
- 50
- gegebenenfalls Zugabe einer geeigneten Reagentienlösung,
 - Auflösung der Komplexe zur Freisetzung der Nukleinsäuren unter nicht bindenden oder bindenden Bedingungen und
 - Isolierung der freigesetzten Nukleinsäure.
- 55
29. Kit zur Stabilisierung und/oder Isolierung von Nukleinsäuren, umfassend mindestens eine kationische Verbindung wie definiert in einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche 1 bis 14.
30. Kit nach Anspruch 29, umfassend weiterhin geeignete Puffer.

EP 1 031 626 A1

31. Kit nach einem der Ansprüche 29 und/oder 30, wobei das Kit weiterhin geeignete Mittel zur Unterstützung der Lyse und/oder Mittel zur Aufreinigung und/oder Mittel zur enzymatischen Einwirkung und/oder Mittel zur mechanischen Einwirkung enthält.

5 32. Verwendung einer Verbindung wie definiert in einem der Ansprüche 1 bis 14 zur Stabilisierung und/oder Isolierung von Nukleinsäuren.

10 33. Verwendung einer Verbindung wie definiert in einem der Ansprüche 1 bis 14 in einem automatisierten Verfahren zur Stabilisierung und/oder Isolierung von Nukleinsäuren.

15 34. Komplex, enthaltend eine Nukleinsäure und mindestens eine kationische Verbindung, wie definiert in einem der Ansprüche 1 bis 14.

15 35. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend mindestens eine kationische Verbindung wie definiert in einem der Ansprüche 1 bis 14 oder einen Komplex nach Anspruch 34.

36. Diagnostische Zusammensetzung, enthaltend mindestens eine kationische Verbindung wie definiert in einem der Ansprüche 1 bis 14 oder einen Komplex nach Anspruch 34.

20 37. Zusammensetzung für die Forschung, enthaltend mindestens eine kationische Verbindung, wie definiert in einem der Ansprüche 1 bis 14 oder einen Komplex nach Anspruch 34.

38. Kationische Verbindung wie definiert in einem der Ansprüche 1 bis 14.

25

30

35

40

45

50

55

Abbildung 1: Intaktheit der RNA

Alle Proben werden in Doppelbestimmungen angesetzt. Jeweils 30 µl des Eluates werden in einem 1,2 %igen Agarose/Formaldehyd/MOPS-Gel aufgetrennt.

Spur 1: Längenmarker 0,24 - 9,5 kB

Spur 2/3: HeLa-RNA stabilisiert mit Ethandiyl-1,2-bis(dimethyldecylammoniumbromid)

Spur 4/5: Kontrolle

Spur

1 2 3 4 5

10 min Raumtemperatur



24 h 4°C

48 h 4°C

Abbildung 2:

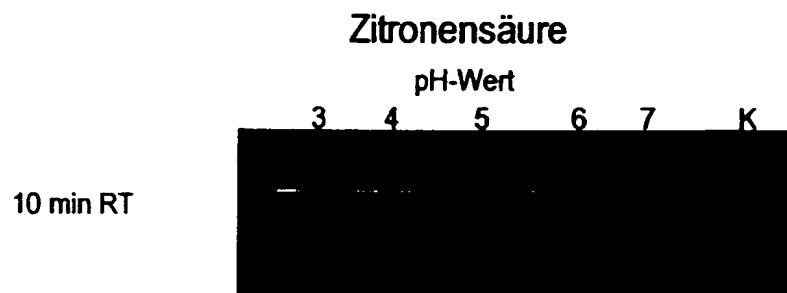


Abbildung 3:

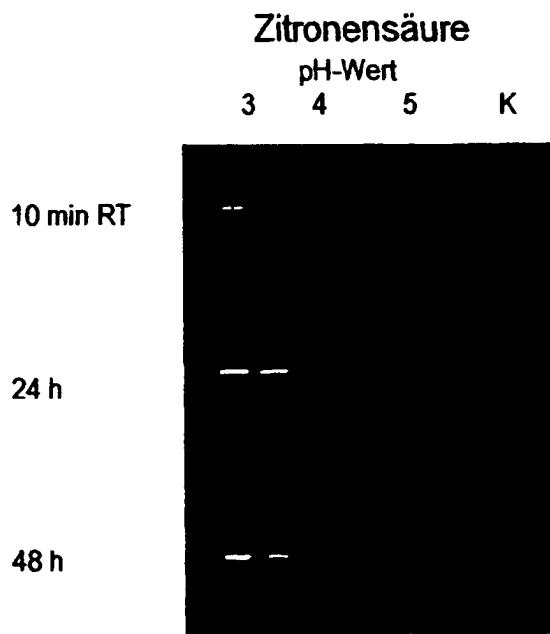


Abbildung 4:

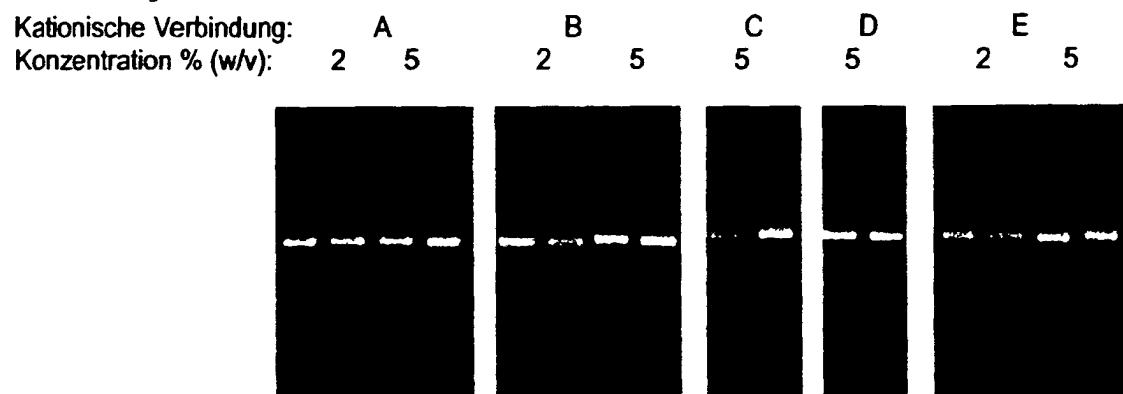


Abbildung 5:

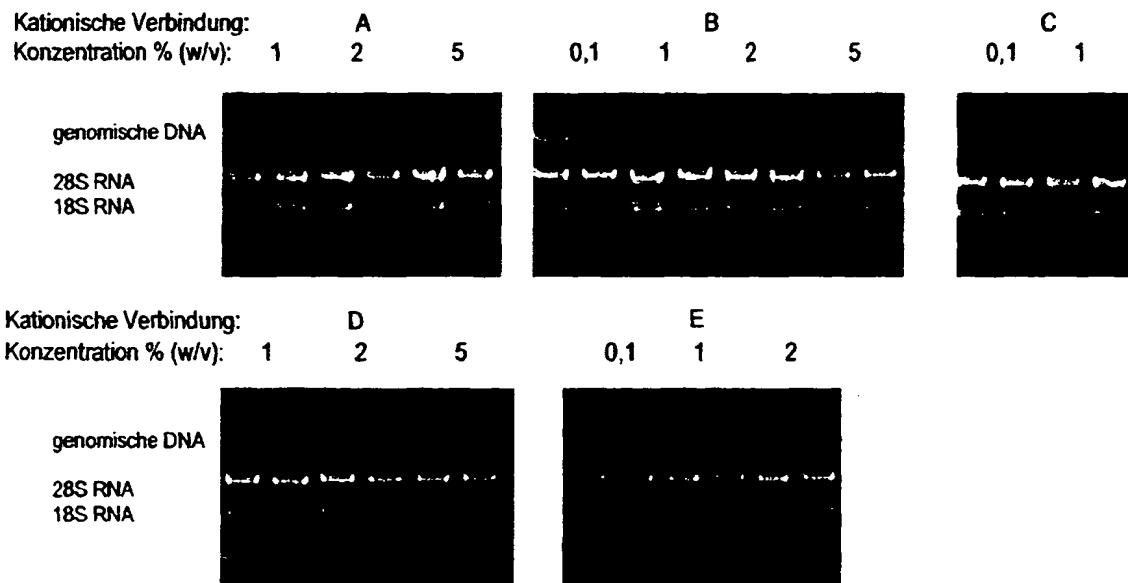


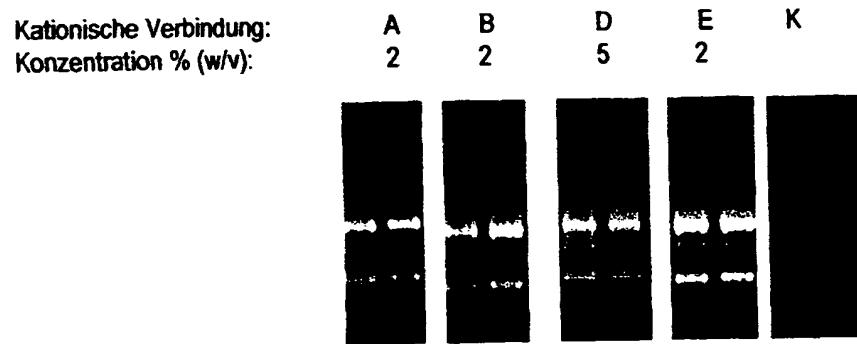
Abbildung 6:

Kationische Verbindung: A B C D E

Konzentration % (w/v): 5 0,1 2 2 0,1



Abbildung 7:





Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT

der nach Regel 45 des Europäischen Patent-
übereinkommens für das weitere Verfahren als
europäischer Recherchenbericht gilt

Nummer der Anmeldung

EP 00 10 3816

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 8445 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 84-281416 XP002111373 & SU 1 081 171 A (KIEV DOTORS TRAIN), 23. März 1984 (1984-03-23) * Zusammenfassung *	1,3, 16-18, 20-22, 27-34,38	C12N15/10 C07D295/037 C07C211/63
Y		1-33	
X	SYKORA ET AL: "Method of plasmid removal from bacterial cells" CHEMICAL ABSTRACTS, Bd. 7, Nr. 115, 19. August 1991 (1991-08-19), XP002111378 Columbus, Ohio, US abstract no. 66241 * Zusammenfassung *	1,3, 16-18, 20-22, 27-34,38	
Y	& CS 266 103 A (SZECH) ---	1-33	
		-/-	
			RECHERCHIERTE SACHGEBiete (Int.Cl.7)
			C12N C07D C07C
UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE			
<p>Die Recherchenarbeit ist der Auffassung, daß ein oder mehrere Ansprüche, den Vorschriften des EPU in einem solchen Umfang nicht entspricht bzw. entsprechen, daß sinnvolle Ermittlungen über den Stand der Technik für diese Ansprüche nicht, bzw. nur teilweise, möglich sind.</p> <p>Vollständig recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Unvollständig recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Nicht recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Grund für die Beschränkung der Recherche:</p> <p>Siehe Ergänzungsblatt C</p>			
Racherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
DEN HAAG	26. Mai 2000	Hornig, H	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN		<p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>	
<small>EPO FORM 1503.03.82 (PD/C98)</small>			



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER
TEILRECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 00 10 3816

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich der maßgeblichen Teile	Betreff Anspruch	
X	SYKORA ET AL: "Elimination of plasmids pKM 101 and F' lac from <i>Salmonella typhimurium</i> and <i>Escherichia coli</i> by bisammonium salt. The effect of outer membrane pattern" CHEMICAL ABSTRACTS, Bd. 25, Nr. 115, 23. Dezember 1991 (1991-12-23), XP002111379 Columbus, Ohio, US Abstract no. 275625	1,3, 16-18, 20-22, 27-34, 38	
Y	* Zusammenfassung * & FOLIA MICROBIOL. (PRAGUE) (1991), 36(3), 240-5; CODEN: FOMIAZ; ISSN: 0015-5632, ---	1-33	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)
X	HORNIAK ET AL: "Interaction of DNA and DNA-calcium-model phosphatidylcholine membrane complex with surface active bisammonium salts" CHEMICAL ABSTRACTS, Bd. 3, Nr. 110, 16. Januar 1989 (1989-01-16), XP002111380 Columbus, Ohio, US Abstract no. 20127 * Zusammenfassung * & STUD. BIOPHYS. (1988), 124(1), 61-8; CODEN: STBIBN; ISSN: 0081-6337,	34, 37, 38	
X	WO 98 19709 A (QIAGEN GMBH ;WEBER MARTIN (DE); ERBACHER CHRISTOPH (DE)) 14. Mai 1998 (1998-05-14) * Seite 9, Zeile 24 - Zeile 27; Ansprüche 1-17 *	34-38	
Y	EP 0 773 295 A (OTTAWA CIVIC HOSPITAL) 14. Mai 1997 (1997-05-14) * Ansprüche 1-28; Beispiel 7; Tabelle 7 *	1-33	
X		34-38	
		-/-	



Europäisches
Patentamt

**EUROPÄISCHER
TEILRECHERCHENBERICHT**

Nummer der Anmeldung
EP 00 10 3816

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich der maßgeblichen Teile	Betriefl Anspruch	
Y	WO 94 18156 A (UNIV IOWA RES FOUND) 18. August 1994 (1994-08-18) * das ganze Dokument *	1-33	
Y	US 5 010 183 A (MACFARLANE DONALD E) 23. April 1991 (1991-04-23) * das ganze Dokument *	1-33	
Y	DE 21 54 278 A (CRINOS INDUSTRIA FARMACOBIOLÓGICA S.P.A., VILLA GUARDIA (ITALIAN)) 25. Mai 1972 (1972-05-25) * Seite 2, Zeile 24 – Zeile 28; Ansprüche 1-4 *	1-33	
	-----		RECHERCHIERTE SACHGEBiete (Int.Cl.7)



Europäisches
Patentamt

UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE
ERGÄNZUNGSBLATT C

Nummer der Anmeldung
EP 00 10 3816

Vollständig recherchierte Ansprüche:
1-37

Unvollständig recherchierte Ansprüche:
38

Grund für die Beschränkung der Recherche:

Die Recherche hat eine so grosse Anzahl besonders relevanter Dokumente, speziell im Hinblick auf die Neuheit offenbart, dass die Erstellung eines vollständigen Europäischen Recherchenberichtes nicht möglich ist. Die zitierten Dokumente sind als repräsentative Auswahl aus den gefundenen Dokumenten anzusehen, insbesondere unter Berücksichtigung ihrer Bedeutung im Hinblick auf den durch die Beispiele veranschaulichten Gegenstand vorliegender Anmeldung.

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 00 10 3816

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
 Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
 Diese Angaben dienen nur zur Orientierung und erfolgen ohne Gewähr.

26-05-2000

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
SU 1081171	A	23-03-1984	KEINE		
WO 9819709	A	14-05-1998	AU	5315698 A	29-05-1998
EP 0773295	A	14-05-1997	US	5780448 A	14-07-1998
			CA	2189831 A	08-05-1997
			JP	9285291 A	04-11-1997
			NO	964713 A	09-05-1997
			EP	0839913 A	06-05-1998
WO 9418156	A	18-08-1994	US	5300635 A	05-04-1994
			AU	6230594 A	29-08-1994
			JP	8506340 T	09-07-1996
			US	5985572 A	16-11-1999
			US	5728822 A	17-03-1998
US 5010183	A	23-04-1991	KEINE		
DE 2154278	A	25-05-1972	IT	1043823 B	29-02-1980
			DE	2154277 A	25-05-1972
			FR	2131248 A	10-11-1972
			FR	2131249 A	10-11-1972
			GB	1366647 A	11-09-1974
			GB	1367656 A	18-09-1974
			JP	52029320 B	01-08-1977
			SE	385902 B	26-07-1976
			SE	385376 B	28-06-1976
			US	3770720 A	06-11-1973
			US	3899481 A	12-08-1975

THIS PAGE BLANK (USPTO)